



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPTO. DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

“ ENCAPSULADOS DE LUTEINA-ENOCIANINA Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS ”

Profesor Patrocinante:
Sra. Alicia Rodríguez M.
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química.
Universidad de Chile.

Directores de Memoria:
Sra. Andrea Bunger T.
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química.
Universidad de Chile.

Sra. Paz Robert C.
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química.
Universidad de Chile.

SANDRA ELIZABETH ESCALONA LÓPEZ

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Santiago, 2004

DEDICATORIA

*A Mis Padres,
Teresa y Nelson.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer...

A mis padres, por su constante e incondicional apoyo, por su paciencia y amor,

A las profesoras Alicia Rodríguez y Andrea Bunger por su buena disposición,

A las personas que colaboraron en los estudios para la realización de ésta tesis,

Al profesor Jorge Chávez, por su colaboración y amabilidad,

De manera especial, agradezco a la profesora Paz Robert, por su buena disposición, su alegría, su aporte a mis conocimientos y, por supuesto, por cultivar mi paciencia.

Gracias a todos los que me acompañaron haciendo esta vida más hermosa.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS	iv
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMMARY.....	x
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Revisión bibliográfica.....	2
1.1.1 Métodos de encapsulación.....	3
1.1.2 Materiales de encapsulación.....	5
1.1.2.1 Maltodextrina.....	5
1.1.2.2 Aislado de proteína de soja.....	6
1.1.3 Luteína y Encocianina: pigmentos naturales.....	7
1.1.3.1 Luteína.....	7
1.1.3.2 Encocianina.....	8
1.2 OBJETIVOS.....	11
1.2.1 Objetivo general.....	11
1.2.2 Objetivos específicos.....	11
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1 Materiales.....	12
2.1.1 Materias primas.....	12
2.1.2 Equipos.....	12
2.2 Metodología de trabajo.....	13

2.2.1	Preparación de las soluciones.....	13
2.2.2	Secado spray.	14
2.2.3	Estudio morfológico de los pigmentos encapsulados.....	14
2.2.4	Determinación de la humedad de los pigmentos encapsulados.....	15
2.2.5	Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados.....	15
2.2.6	Análisis de color instrumental.....	16
2.2.7	Análisis cinético.....	17
2.2.8	Evaluación sensorial: Focus Group.....	18
2.2.9	Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados aplicados en crema.....	18
2.2.10	Análisis estadístico.....	19
III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1	Encapsulados de Luteína-Enocianina.....	20
3.2	Estudio morfológico de los encapsulados.....	22
3.3	Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados con maltodextrina.	24
3.4	Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados con APS.....	31
3.5	Estabilidad de los pigmentos encapsulados en la crema.....	34
3.6	Evaluación sensorial: Focus Group.....	36
IV	CONCLUSIONES.....	38
V	BIBLIOGRAFIA.....	39
VI	ANEXOS.....	42

INDICE DE TABLAS

TABLA 3.1: Parámetros de color de los encapsulados de luteína y enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante, durante el almacenamiento a 40, 60 y 80°C.....	28
TABLA 3.2: Constantes de velocidad de degradación (k) y r para los pigmentos encapsulados con maltodextrina.....	29
TABLA 3.3: Parámetros de Arrhenius y termodinámicos para los pigmentos encapsulados con maltodextrina.....	30
TABLA 3.4: Parámetros de color de los encapsulados de luteína y enocianina utilizando APS como agente encapsulante, durante el almacenamiento a 40, 60 y 80 °C.....	31
TABLA 3.5: Parámetros de color de los encapsulados de luteína y enocianina aplicados en crema de leche almacenada a 5°C.....	34
TABLA 3.6: Resumen de las opiniones obtenidas del Focus Group.....	36

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1:	Equipo de secado spray.....	4
Fig. 1.2:	Estructura de la luteína.....	7
Fig. 1.3:	Estructura de las antocianidinas.....	9
Fig. 2.1:	Diagrama de bloques para la preparación de la mezcla a secar.....	13
Fig. 2.2:	Espacio de colores CIELab.....	16
Fig. 3.1:	Pigmentos encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante.....	21
Fig. 3.2:	Pigmentos encapsulados de luteína-enocianina utilizando APS como agente encapsulante.....	21
Fig. 3.3	Microcápsulas de pigmentos naturales utilizando maltodextrina como agente encapsulante.....	22
Fig. 3.4	Microcápsulas de pigmentos naturales utilizando APS como agente encapsulante.....	23
Fig. 3.5	Relación entre a^* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con maltodextrina a 40, 60 y 80°C.....	24
Fig. 3.6	Relación entre b^* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con maltodextrina a 40, 60 y 80°C.....	25
Fig. 3.7	Relación entre Hue y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con maltodextrina a 40, 60 y 80°C.....	26
Fig. 3.8	Gráfico de degradación de pseudo-primer orden para pigmentos de luteína-enocianina encapsulados con maltodextrina.....	27
Fig. 3.9	Relación entre Hue y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS a 40, 60 y 80°C....	32

Fig. 3.10	Relación entre b^* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS a 80°C.....	33
Fig. 3.11	Relación entre a^* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS aplicados en crema de leche.....	35
Fig. 3.12	Relación entre b^* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS aplicados en crema de leche.....	35
Fig. 3.13	Tonalidades presentadas en el estudio de Focus Group..	36

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	ANOVA de tres vías para los encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante.....	42
ANEXO 2:	Análisis de regresión simple para los pigmentos superficiales y encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante.....	49
ANEXO 3:	Análisis comparativo de las constantes de velocidad degradación de los pigmentos superficiales (k_s) y encapsulados (k_e), utilizando maltodextrina como agente encapsulante.....	54
ANEXO 4:	ANOVA de tres vías para los encapsulados de luteína-enocianina utilizando APS como agente encapsulante....	57
ANEXO 5:	Parámetros de color de los encapsulados de luteína y enocianina aplicados en crema de leche almacenada a 5°C.....	64
ANEXO 6:	Resumen de las opiniones obtenidas del Focus Group.....	68

RESUMEN

Los colorantes aportan un valor agregado a prácticamente todos los productos alimenticios. La mezcla de dos pigmentos naturales y funcionales, encianina (azul-morado) y luteína (amarillo-anaranjado) hace posible la obtención de un color verde, presentándose así como una posible alternativa al uso de la clorofila, la cual presenta gran inestabilidad en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos.

Pigmentos de encianina-luteína fueron encapsulados con maltodextrina 19 ED y aislado proteico de soja (APS) por secado spray. Se observó la estructura externa de ambos encapsulados por medio de un microscopio de barrido (SEM). Se estudió la estabilidad de los pigmentos encapsulados a 40, 60 y 80°C en oscuridad y en presencia de oxígeno. La degradación de los pigmentos encapsulados con maltodextrina 19 DE siguió una cinética de pseudo-primer orden presentando dos constantes de velocidad. Los pigmentos encapsulados con APS prácticamente no presentaron variación a 40 y 60°C. Se realizó un estudio sensorial con consumidores (Focus Group) utilizando el encapsulado más estable (APS) a 3 concentraciones diferentes, obteniendo posibles usos de este colorante en alimentos. Se estudió la estabilidad del encapsulado con APS adicionado a crema espesa durante 30 días a 5°C, mostrando gran estabilidad del colorante verde natural encapsulado con APS.

Este trabajo forma parte del proyecto CEPEDEQ 2002 “Estudio de la estabilidad, estructura y aceptabilidad de nuevas emulsiones coloreadas funcionales para productos alimenticios”

SUMMARY

“Encapsulated of luteine-enocianine and their application in foods”

The colorants contribute to give a plus to practically all nutritional products. With the mixture of two natural and functional pigments, enocianine (blue-dwelled) and luteine (yellow-orange), it is possible to obtain a green color, with the purpose of to be an alternative to the use of the chlorophyll, which displays great instability in the processing and storage of foods.

Enocianine-luteine pigments were encapsulated with maltodextrine 19 DE and soybean proteic isolated (SPI) by spray drying. The external structure of both encapsulated products was observed by means of scanning electronic microscopy (SEM). Stability of pigments encapsulated were studied to 40, 60 and 80°C in absence of light and in oxygen atmosphere. The results showed that the degradation of the pigments encapsulated with maltodextrine 19 DE had a pseudo-first order kinetic with two rate constants. The pigments encapsulated with SPI did not display changes at 40 and 60°C practically. A sensorial study with consumers (Focus Group) was carried out using the most stable encapsulated product (SPI) of this study at 3 different concentrations, with the purpose of obtaining possible uses of the enocianine-luteine pigments in foods. A stability study was carried out with a mix between the encapsulated SPI product and a thick-cream, during 30 days at 5°C; the results showed a product with a good stability.

This proyect was supported by CEPEDEQ 2002 “New colored emulsions for nutritious products: stability, structure and aceptability studies”.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

El color es uno de los atributos más importantes de la calidad sensorial de un alimento ya que es la primera sensación que se percibe y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Por esto, la industria de alimentos utiliza colorantes naturales y/o artificiales para restaurar el color perdido por los diversos procesos de tecnología, o bien, para otorgar el color deseado por el consumidor (Rodríguez, 2002).

En los últimos años, las tendencias mundiales indican un interés acentuado de los consumidores por los alimentos funcionales. Así, se busca reemplazar el uso de colorantes artificiales por colorantes naturales que además de ser atractivos para los consumidores aporten beneficios a las funciones biológicas del organismo humano y sean estables en el tiempo.

La luteína es un pigmento de color amarillo-anaranjado perteneciente a la familia de los carotenoides, es altamente sensible a la isomerización y oxidación durante el procesamiento y almacenaje, dando como consecuencia pérdida del color y actividad biológica. Por otro lado, la enocianina es un pigmento de color morado-azul perteneciente a los antocianos, es relativamente inestable y se degrada, cambiando de color, durante el almacenamiento (Fennema, 1993).

La mezcla de estos dos pigmentos naturales (luteína y enocianina) en proporciones adecuadas, hace posible la obtención de un color verde, presentándose así como una posible alternativa al uso de la clorofila.

La encapsulación de pigmentos en matrices protectoras permite aumentar su vida útil ya que los materiales encapsulados son protegidos de la humedad y del oxígeno, además de facilitar y extender su aplicación (Robert y cols., 2003)

1.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la actualidad existen numerosos ingredientes encapsulados: agentes saborizantes, ácidos, bases, endulzantes artificiales, colorantes, preservantes, agentes leudantes, aromas y nutrientes (Dziezak, 1988).

La encapsulación es definida como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en miniatura. Esto implica el recubrimiento de un ingrediente sensible, ya sea puro o una mezcla, dentro de un material para otorgar protección contra la humedad, calor u otras condiciones extremas, de modo de mejorar su estabilidad y aumentar su vida útil. En el encapsulado, la porción activa es llamada núcleo, fase interna o relleno, y el material encapsulante es llamado cáscara, recubrimiento o material de pared y puede variar tanto en espesor como en el número de capas. La forma de las cápsulas es generalmente esférica, pero se ven fuertemente influenciadas por la estructura del material original no encapsulado (Dziezak, 1988).

La encapsulación de ingredientes en la industria de alimentos permite: (Dziezak, 1988)

- Estabilizar el material núcleo.
- Controlar la liberación del material núcleo (velocidad y comienzo de la liberación).
- Separar reactivos o componentes incompatibles en una formulación.
- Protección de componentes sensibles del alimento (luz, humedad, calor).
- Aseguramiento contra pérdidas nutricionales.
- Utilización alternativa de ingredientes sensibles.
- Incorporación de mecanismos de liberación inusuales de tiempo dentro de la formulación.
- Enmascarar o preservar sabores y aromas.
- Transformar ingredientes líquidos en sólidos fácilmente manejables.

La encapsulación no es una tecnología nueva. Las investigaciones datan de 1930, donde la National Cash Register Co desarrolló el denominado “papel carbón sin carbón”, siendo comercializado en 1954. Este

consistió en la encapsulación de tinta, por un proceso llamado coacervación, en que las cápsulas eran depositadas en una fina capa sobre el papel que, mediante la presión ejercida por el lápiz o la máquina de escribir, se producía su ruptura y liberación de la tinta (Dziezak, 1988).

En 1950, el Southwest Research Institute desarrolló un proceso mecánico para encapsular líquidos o sólidos utilizando un material de recubrimiento que es sólido a temperatura ambiente, creando una máquina de encapsulación para producir cápsulas de gasolina para uso militar. En este mismo año, el Dr. Wurster inventó un proceso para cubrir y granular tabletas y píldoras farmacéuticas; éste consistía en la atomización de material de recubrimiento sobre partículas suspendidas en una columna de aire (Dziezak, 1988).

1.1.1 METODOS DE ENCAPSULACIÓN

Existen varios métodos para lograr la encapsulación de ingredientes entre los que se encuentran: secado spray, recubrimiento en suspensión de aire, extrusión, spray cooling y spray chilling, coacervación, complejos de inclusión y polimerización interfacial (Dziezak, 1988). La selección del método de encapsulación estará en función de los costos, de las propiedades del material a encapsular, del tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación (Pedroza, 2002).

El método de secado spray es el método más utilizado en la industria de alimentos, debido a que es un proceso económico, flexible y produce partículas de buena calidad (Dziezak, 1988). Este proceso consiste en atomizar el material que se encuentra en estado líquido, ya sea como solución o como dispersión, en forma de finas gotas sobre una corriente de gas calentado. Cuando las pequeñas gotas del líquido toman contacto con el gas a mayor temperatura se produce una rápida evaporación del solvente, formándose una fina película del material de recubrimiento que se encuentra

disuelto en él (Arancibia, 1981). Las microcápsulas usualmente caen en el rango de varios micrones hasta aproximadamente 200 μm (Luzzi, 1970).

En este proceso, se pueden identificar tres pasos básicos: (Dziezak, 1988)

- Preparación de la dispersión o emulsión a ser procesada.
- Homogeneización de la dispersión.
- Atomización de la masa dentro de la cámara de secado.

Este proceso se realiza en un secador spray que se compone básicamente de un sistema de alimentación del líquido, un dispositivo de atomización (disco que gira a alta velocidad), una cámara de atomización y un sistema colector del producto seco (Arancibia, 1981)(Fig.1.1).



Fig.1.1: Equipo de Secado Spray.

La rápida evaporación del agua del recubrimiento durante su solidificación mantiene el material núcleo por debajo de los 100°C, a pesar de las altas temperaturas utilizadas en el proceso (Dziezak, 1988). Esto, junto a que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5

a 20 s) hace a este proceso apropiado para materiales sensibles al calor (Pedroza, 2002).

1.1.2 MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN

Existe una amplia variedad de materiales de recubrimiento; sin embargo, es importante considerar las características de éste en cuanto a flexibilidad, fuerza o resistencia, permeabilidad, facilidad de aplicación, naturaleza hidrofóbica o hidrofílica, ya que todas ellas influirán en las características del producto final (Arancibia, 1981).

Entre los materiales de recubrimiento utilizados están polisacáridos (almidón, maltodextrinas, ciclodextrinas, carboximetil celulosa, gomas arábica, y mezquite, alginato de sodio), lípidos (ceras, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soja, caseinatos, suero de leche, zeína) (Pedroza, 2002).

A continuación se describen características de los materiales de recubrimiento utilizados en este trabajo: maltodextrina y aislado proteico de soja.

1.1.2.1 Maltodextrina:

La FDA define las maltodextrinas como un polímero sacárido nutritivo no dulce que consiste en unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces α (1-4) y que tienen un equivalente de dextrosa (ED) menor que 20. Es preparado como un polvo blanco o en solución concentrada por hidrólisis parcial del almidón de maíz o de papa con ácidos permitidos o enzimas (21 Code of Federal Regulation)(Kuntz, 1997).

Las maltodextrinas son clasificadas por su ED. El ED se relaciona con el grado de polimerización (GP) de la molécula de almidón, de acuerdo a $ED = 100/GP$. El grado de polimerización corresponde al número de unidades monoméricas o monosacáridas. A más alto ED mayor es el número de unidades monosacáridas y los polímeros son de cadena más

corta. La glucosa (dextrosa) posee un ED = 100 y el almidón es aproximadamente cero. Debido a que las maltodextrinas consisten en una mezcla de polímeros de varios largos (glucosa, maltosa, oligosacáridos y polisacáridos) el ED es un valor promedio (Kuntz, 1997).

Las maltodextrinas presentan baja higroscopicidad, buena solubilidad y bajo poder edulcorante. Son utilizadas en la industria de alimentos en caramelos (30%), pastelería (20%), sopas y caldos (20%), productos lácteos (10%), bebidas cítricas (10%), alimentos para bebés (10%), entre otros (Szejieta, 2002).

1.1.2.2 Aislado de Proteína de Soja (APS):

La soja es una planta leguminosa de la familia de las Papilionoidea y del grupo de las Faseoleas, es originaria de China y su utilización se remonta al siglo 15 a.C. (Daydé, 2000).

El grano de soja está compuesto de un 30% de hidratos de carbono (de los cuales el 15% es fibra), un 18% de aceite (85% insaturado), un 14% de humedad y un 38% de proteína. Los productos proteicos obtenidos de la soja son harina, concentrado y aislado de proteína de soja, los cuáles se diferencian en el contenido de proteína (Kuntz, 1997).

Los concentrados y aislados de proteína de soja contienen un 65 y 90% de proteína en base seca, respectivamente, por lo que suelen usarse como ingredientes funcionales en una amplia variedad de productos alimenticios (Kuntz, 1997).

Los APS están compuestos en su mayor parte de globulinas (75% de las proteínas del grano), donde se encuentran la glicina (11S) y la β -conglucina (7S). La glicina comprende 12 sub-unidades, su mayoría hidrofóbicas, es rica en azufre, y la β -conglucina (7S) es pobre en aminoácidos azufrados. Las concentraciones de ambas globulinas están relativamente en equilibrio (Daydé, 2000).

La proteína de soja presenta diversas funciones biológicas beneficiosas para la salud como: reducción del colesterol LDL y disminución

del riesgo de enfermedades cardiovasculares, reducción del riesgo de cáncer de mama, próstata y colon, disminución la pérdida de calcio en la orina lo que mejora la función renal y salud ósea (Mariotti y Tomé, 2000).

1.1.3 LUTEÍNA Y ENOCIANINA: PIGMENTOS NATURALES

1.1.3.1 Luteína:

Los carotenoides son tetraterpenos de 40 átomos de carbono con 8 unidades isoprenoides, unidas de tal manera que se invierte en el centro. Los carotenoides se dividen en carotenos y xantofilas. Estos últimos corresponden a los derivados oxigenados. La luteína es una xantofila de fórmula $C_{40}H_{56}O$ (Rodríguez, 2000).

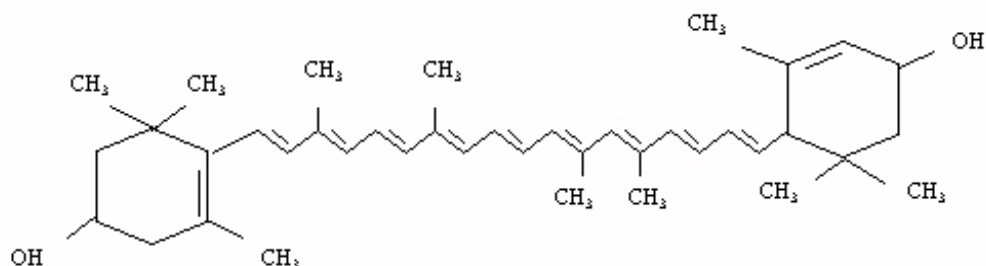


Fig.1.2: Estructura de la luteína.

El nombre de luteína proviene del latín *luteum* (huevo) *luteus* (amarillo), un pigmento amarillo–naranja de la familia de los carotenoides que está presente en la yema de huevo, flores de caléndula, maíz y en los vegetales de hoja verde. La luteína no es biosintetizada por el organismo humano por lo que debe ser obtenida de los alimentos o suplementos vitamínicos (Safont, 2004).

La luteína es un potente antioxidante biológico. Este carotenoide está presente en todo el cuerpo humano y principalmente es acumulado en el punto de la retina llamado mácula lútea, en el cual la percepción visual es más aguda. Esta zona es rica en ácidos grasos poliinsaturados que son

atacados por los radicales libres y sufren un proceso de oxidación debido a la incidencia de la luz. De este modo, la luteína funciona de dos formas: (Silva, 2004)

- Como un filtro de la luz azul.
- Como un antioxidante que atrapa radicales libres y especies de oxígeno reactivo.

La luteína previene problemas en la visión relacionados con la edad, como la degeneración macular y las cataratas. También se ha relacionado a la luteína con la disminución del riesgo de enfermedades coronarias. La ingesta diaria recomendable de luteína es 6 mg/día (Silva, 2004).

Los carotenoides son susceptibles a la isomerización y oxidación durante el procesamiento y almacenaje, dando como consecuencia pérdida del color, actividad biológica y formación de compuestos volátiles que imparten sabores indeseables; sin embargo, son moderadamente termoestables y su degradación es principalmente por oxidación (Rodríguez, 2000).

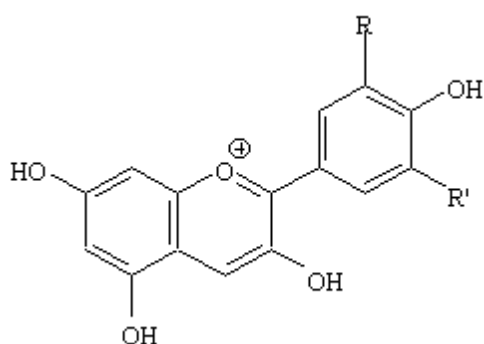
La luteína es utilizada en productos tales como zumos y tortas, alimentación avícola y acuícola, además de la industria de alimentos funcionales (Silva, 2004).

1.1.3.2 Enocianina:

La enocianina, llamada también “extracto de cáscara de uva”, es una mezcla de antocianos formados por peonidina, malvidina, delfidina y petunidina, extraídos de la piel de las uvas tintas obtenidas como subproductos de la fabricación del vino (Rodríguez, 2002).

Los antocianos constituyen un grupo de pigmentos hidrosolubles responsables de la coloración roja, azul o violeta de la mayoría de las flores y frutos. Son estructuras polifenólicas con una configuración $C_6-C_3-C_6$ con un oxoniun (carga positiva localizada en el átomo de oxígeno en el heterociclo central (Schwartz y Muñoz, 2003). Como se muestra en la Fig. 1.3, la estructura básica de las antocianinas es el 2- fenilbenzopirilio de la sal de

flavilio. Esta estructura es particularmente sensible al pH lo cual hace a las antocianinas muy inestables: en medio ácido son de color rojo, viran al violeta y después al azul oscuro cuando el pH se hace alcalino. Su color depende de los sustituyentes R y R' que pueden ser hidroxilos o metoxilos (Fig.1.3) (Fennema, 1993).



Pelargonidina: R = R' = H
 Cianidina: R = H, R' = OH
 Delfidina: R = R' = OH
 Malvidina: R = R' = OCH₃
 Peonidina: R = OCH₃
 R' = H
 Petunidina: R = OCH₃
 R' = OH

Fig. 1.3: Estructura de la antocianidinas (JECFA; 1984).

Los pigmentos de antocianina son relativamente inestables, teniendo un comportamiento aceptable únicamente en medio ácido. Se degradan, cambiando el color, durante la extracción del tejido vegetal, procesado y almacenamiento de alimentos. Los factores que influyen en la degradación son: pH, temperatura y concentración de oxígeno. Sin embargo, también les afecta la luz, la presencia de enzimas degradativas, ácido ascórbico, dióxido de azufre, iones metálicos y azúcares (Fennema, 1993).

En la industria de alimentos los antocianos se utilizan en productos ácidos con un pH 4 o inferior, como jaleas, confituras, mermeladas y con menor frecuencia en productos cárnicos, lácteos, de pastelería, vegetales, vinos y conservas de pescado (Rodríguez, 2002).

Los antocianos no solo tienen interés por su uso como colorantes naturales sino también por sus propiedades de coadyudantes de la salud y nutracéutico, ya que su estructura polifenólica da una capacidad antioxidante. Investigadores han reportado que los fenoles contenidos en las uvas previenen la arteriosclerosis, inhiben la oxidación de LDL (intermediarios de baja densidad) in vitro y tienen actividad antibacteriana en sistemas in vitro (Schwartz y Muñoz, 2003).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Estudiar la estabilidad de encapsulados de color verde formados de una mezcla de luteína y encianina y su posible aplicación en un alimento.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Preparar una mezcla coloreada en base de luteína y encianina, para su encapsulación por secado spray, utilizando maltodextrina y aislado proteico de soja como agentes encapsulantes.
2. Estudiar la estabilidad del color en el tiempo de los pigmentos encapsulados, a 40, 60 y 80°C, parámetros de Arrhenius y termodinámicos.
3. Evaluar la microestructura externa de los encapsulados luteína-encianina con maltodextrina y APS, utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM).
4. Aplicar el encapsulado de luteína- encianina de mayor estabilidad a crema de leche (crema espesa) en tres concentraciones diferentes de pigmentos encapsulados y evaluar sensorialmente las tonalidades verdes obtenidas a través de un estudio de grupo focalizado (“focus group”) para seleccionar la concentración mejor aceptada.
5. Estudiar la estabilidad del color en el tiempo de los pigmentos encapsulados aplicados a la crema (concentración mejor aceptada), utilizando medidas de color instrumental.

Capítulo II

MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materias primas

- Enocianina (Floramatic, Chile)
- Luteína 5%, soluble en agua (Roche). Composición: luteína, sucrosa, gelatina, almidón de maíz, ascorbato de sodio, ascorbil palmitato, α -tocoferol.
- Maltodextrina de 19-22% ED (Prinal, Chile)
- Aislado proteico de soja (Prinal, Chile)
- Crema de leche (espesa) (Nestlé). Composición: crema de leche (25% materia grasa) y carragenina.
- Hidróxido de Sodio 0,1 N
- Etanol
- Agua destilada

2.1.2 Equipos

- Equipo de secado spray B-191, Buchi (Switzerland).
- Colorímetro Labscan, marca HunterLab sistem DP- 900 (E.E.U.U).
- Microscopio electrónico de barrido, marca JEOL, JSM-25SII.
- 3 estufas de secado, marca Heraeus (Germany), estabilizadas a 40, 60 y 80°C.
- Agitador magnético, marca Heidolph MR 3001 K (Germany).
- Balanza Analítica, marca Chyo JK-180 (Japan).
- Balanza Granataria, marca Sauter RC 2022 (Switzerland).
- Papel pH, marca Merck.
- Tubos de vidrio con tapa (6,0x3,0cm).
- Viales de vidrio (4,5x2,5 cm).

2.2 METODOLOGÍA DE TRABAJO

2.2.1 Preparación de las soluciones

Las soluciones en base a luteína-enocianina se prepararon en las proporciones descritas por Carrasco (2004), correspondiendo a 80% de enocianina y 20% de luteína hidrosoluble, en el total de colorante (0,3% de la solución final). El siguiente diagrama de bloques muestra la preparación de la solución.

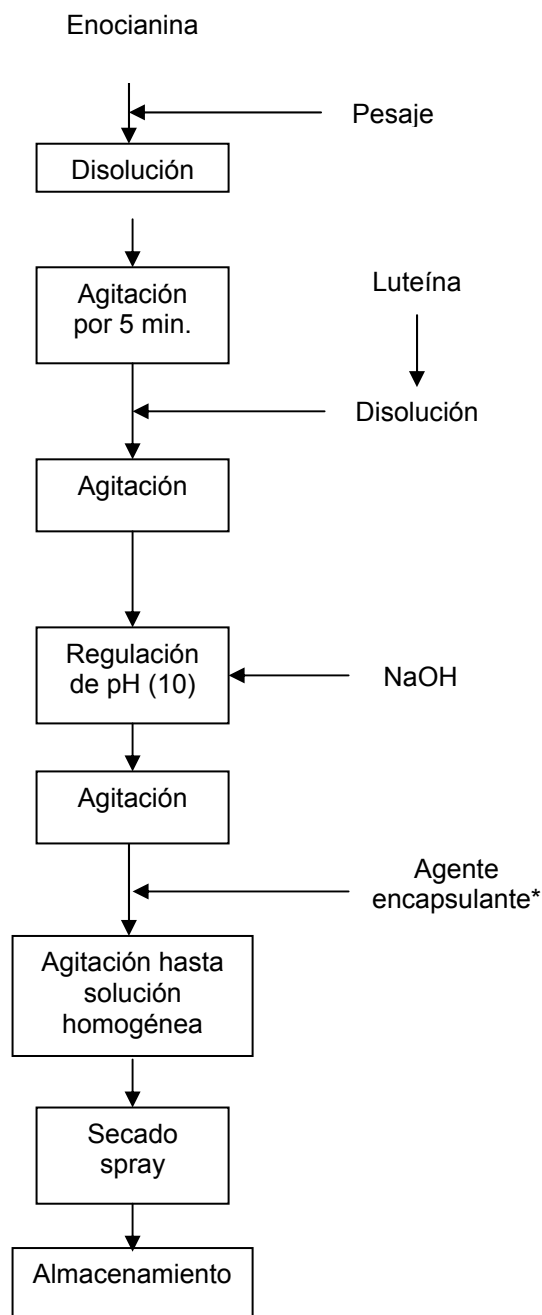


Fig.2.1: Diagrama de bloques para la preparación de la mezcla a secar.
*Maltodextrina (10%) o Aislado Proteico de Soja (2%)

Se prepararon dos soluciones las cuales se diferencian entre sí por el tipo y cantidad de agente encapsulante.

El proceso comienza con el pesaje de las materias primas. La encianina se solubilizó en agua destilada con agitación magnética por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregó la luteína, previamente disuelta en agua destilada, con agitación constante. Se adicionó NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH 10, donde se obtuvo un color verde intenso. Se adicionaron los agentes encapsulantes maltodextrina (10%), para la primera solución, y aislado proteico de soja (2%), para la segunda, agitando constantemente hasta lograr una solución homogénea. Se procedió a pasar por el secador spray.

2.2.2 Secado Spray

Las soluciones de luteína-encianina con los agentes encapsulantes maltodextrina y APS, se secaron en un secador spray facilitado por el Dpto. de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los parámetros de trabajo fueron $T^{\circ}\text{entrada} = 117 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y $T^{\circ}\text{salida} = 75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ para la solución con maltodextrina, y $T^{\circ}\text{entrada} = 95 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y $T^{\circ}\text{salida} = 65 \pm 5^{\circ}\text{C}$ para la solución con APS, flujo de aire 600 l/h, velocidad de alimentación 5ml/min, presión de atomización fue 20 psi.

2.2.3 Estudio morfológico de los pigmentos encapsulados

Se observó la estructura externa de los encapsulados realizados con maltodextrina y con APS en un microscopio electrónico de barrido facilitado por el Servicio de Microscopía Electrónica de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los encapsulados fueron espolvoreados sobre un portamuestra de 10x10 mm con scotch de doble faz dispuesto en la superficie para asegurar su adherencia. Luego fueron sombreados con oro paladio en

un Varian Vacuum Evaporator PS 10E y observados en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-25SII, a 30 kV. Las imágenes fueron obtenidas mediante un Mamiya Roll Film Holder Model 2, utilizando una película Kodak 120 T-Max ISO 100. Se realizó una determinación aproximada del tamaño de las microcápsulas utilizando la barra de referencia que se muestra en la parte inferior de cada fotografía.

2.2.4 Determinación de la humedad de los pigmentos encapsulados

Un gramo de pigmentos encapsulado se colocó en una cápsula de porcelana a 105°C en una estufa de aire forzado, hasta alcanzar peso constante (AOAC*). Los ensayos se realizaron en duplicado para los encapsulados de luteína-enocianina con maltodextrina y con APS.

2.2.5 Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados

Cinco gramos de pigmentos encapsulados con maltodextrina y APS se colocaron en viales de vidrio abiertos (4,5 x 2,5 cm) y se almacenaron en estufas a 40, 60 y 80°C, en ausencia de luz. Los pigmentos encapsulados con maltodextrina se almacenaron durante 77 días a 40°C, y durante 49 días a 60 y 80°C. Los pigmentos encapsulados con APS se almacenaron durante 77 días a 40°C, durante 70 días a 60°C y 80°C. Las muestras se analizaron cada 7 días en el colorímetro HunterLab. Todos los análisis se realizaron en duplicado.

* Official Methods of Analysis of AOAC. 16 th Ed. Washington, DC. The Association. 1996.

2.2.6 Análisis de color instrumental

Se realizó la medición del color de los encapsulados secos de luteína-enocianina con maltodextrina y con APS, y de la crema con los pigmentos encapsulados en APS (0,02 gramos de encapsulado/ gramo de crema), por medio del colorímetro HunterLab, facilitado por el Área de Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Se utilizó el sistema de medición de color CIELab, obteniendo las coordenadas L^* , a^* y b^* , donde L^* indica el brillo u opacidad, a^* y b^* indican el tono (a^* define el color rojo al verde y b^* define el color amarillo al azul) (Calvo,1989). Estas coordenadas se muestran en la Fig. 2.2. Además, los parámetros de lectura fueron: rango de longitud de onda 400-700 nm, iluminante D65 y ángulo del observador 10° . Se utilizó un estándar verde y la medición se tomó en tres partes distintas de la muestra.

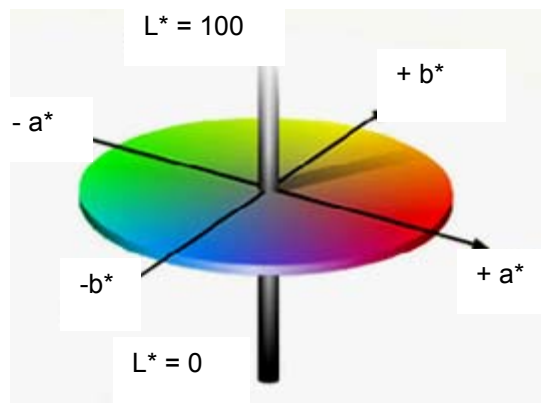


Fig.2.2: Espacio de colores (sistema CIELab)

Los valores L^* , a^* y b^* obtenidos de cada medición fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de tres vías y se transformaron en la función de color ángulo psicrométrico Hue (tono), por la ecuación (1): (Calvo, 1989)

$$\text{Hue} = \tan^{-1} (b^*/a^*) \quad (1)$$

2.2.7 Análisis cinético

Los datos de los pigmentos encapsulados usando maltodextrina como agente encapsulante, se ajustaron a un modelo cinético de pseudo-primer orden de acuerdo a la ecuación (2): (Castellán, 1987)

$$\ln C = \ln C_0 - k t \quad (2)$$

Donde C es la concentración de pigmento en el tiempo t , C_0 es la concentración de pigmento al tiempo inicial, k es la constante de velocidad de degradación y t es el tiempo en días.

El valor Hue (tono) representa una medida del color, la cual se relaciona con la concentración de pigmentos quedando el modelo expresado por la ecuación (3):

$$\ln \text{Hue} = \ln \text{Hue}_0 - k t \quad (3)$$

La energía de activación (E_a) y el factor de frecuencia fueron determinados del modelo de Arrhenius $k = A e^{-E_a/RT}$, donde E_a/R es la pendiente y $\ln A$ es el intercepto del gráfico $\ln k$ frente a $(1/T)$ en kelvin (Castellán, 1987).

La entalpía de activación (ΔH^\ddagger) fue obtenida la relación $\ln (k/T)$ y $(1/T)$, y la entropía de activación (ΔS^\ddagger) fue obtenida de la ecuación (4) basada en la teoría el estado de transición,

$$\ln (k/T) = \ln (k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT \quad (4)$$

Donde k_B es la constante de Boltzman y h es la constante de Planck.

2.2.8 Evaluación sensorial: Focus Group

Se realizó Focus Group (grupo focalizado) donde se presentaron tres tonalidades de color verde de pigmentos encapsulados con APS aplicados en crema de leche. Estas tonalidades se seleccionaron bajo el criterio de ser las más representativas dentro de 8 tonalidades diferentes. Las tonalidades presentadas fueron de concentración 0,05, 0,02 y 0,01 gramos de encapsulados/ gramo de crema. El grupo se constituyó de 8 personas y se realizó 3 veces.

Este estudio cualitativo fue guiado por un moderador. Primero, se introdujo el tema y se buscó obtener información sobre alimentos de color verde y el interés de los participantes por éstos. Luego, se presentaron las tres muestras en igual cantidad, en platos pequeños y transparentes, y se procedió a que los participantes asociaran cada tonalidad con algún alimento conocido para ellos. Finalmente, se dio espacio para opinar de posibles usos que estén o no en el mercado.

2.2.9 Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados aplicados en crema

Se realizó un estudio de estabilidad de color en el tiempo con el encapsulado de luteína-enocianina con APS, en una concentración de 0,02 gramos de encapsulado/gramo de crema (concentración intermedia presentada en el estudio sensorial descrito en el punto 2.2.9).

0,2 gramos de pigmentos encapsulados fueron disueltos en 2 ml de etanol. La mezcla se adicionó a 10 gramos de crema de leche y se almacenó a 5°C en un tubo de vidrio tapado (6,0 x 3,0 cm), durante 30 días. Las

muestras se analizaron cada 7 días en un colorímetro HunterLab. Los ensayos se realizaron en duplicado.

2.2.10 Análisis estadístico

Los experimentos de almacenamiento fueron realizados en duplicado para cada temperatura. Para determinar el orden de la reacción, constantes de velocidad y energías de activación, se utilizó regresión lineal (90% de confianza). Para determinar las diferencias estadísticas entre las constantes de velocidad respecto la temperatura y el tiempo, se realizó un análisis de varianza múltiple (ANOVA de tres vías). Todos los análisis estadísticos fueron calculados utilizando el software Statgraphics Plus, versión 4.0 (Manugistics Inc. Rockville, MA).

Capítulo III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Encapsulados de Luteína y Encocianina

Previo al proceso de encapsulación, se realizaron diferentes pruebas donde se varió el porcentaje de agente encapsulante de modo de formar una solución de viscosidad adecuada para el proceso de secado spray. Se ensayó con 5, 10, 15 y 20% de maltodextrina y con 2, 5, 10 y 15% de APS. Para maltodextrina los mejores resultados se obtuvieron con 10%. Wagner y Warthesen (1995) estudiaron el efecto de ED de almidones y la influencia del porcentaje de agente encapsulante, de α y β carotenos de zanahoria, en la efectividad de encapsulación. Encontró que almidones hidrolizados de alto ED retienen mejor los productos a encapsular. Además demostró que a mayor proporción de agente encapsulante utilizado en la mezcla, disminuye la velocidad de degradación ya que cuando hay más agente encapsulante el contenido de carotenos superficiales es menor; la velocidad de degradación disminuye en un 75 % cuando se utilizó 25% de almidón hidrolizado 15 ED. Maltodextrinas de bajo ED dan baja estabilidad porque contienen grandes cantidades de sacáridos de cadena larga que causan que la barrera sea inflexible y más permeable al oxígeno.

Se utilizó el 2% de APS como agente encapsulante ya que a mayores porcentajes el APS presenta alta viscosidad lo cual dificulta su utilización en el secador spray.

Las Figuras 3.1 y 3.2 muestran los pigmentos de luteína-enocianina encapsulados por secado spray con maltodextrina y APS como agentes encapsulantes.



Fig.3.1: Pigmentos encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante.



Fig.3.2: Pigmentos encapsulados de luteína-enocianina utilizando APS como agente encapsulante.

En las Figuras 3.1 y 3.2 se observa que las tonalidades verdes son distintas al utilizar diferentes agentes encapsulantes. Sin embargo, ambos encapsulados presentaron tonos muy intensos lo cual es importante ya que un colorante debe utilizarse en pequeña cantidad.

El contenido de humedad de los encapsulados obtenidos utilizando maltodextrina y APS fue 5,09 y 6,29 %, respectivamente. Estudios anteriores revelan que la humedad de microcápsulas con maltodextrina ha sido 4,4% (Robert y cols., 2003).

3.2 Estudio morfológico de los encapsulados

Las Figuras 3.3 y 3.4 muestran la estructura externa de las microcápsulas obtenidas del proceso de secado spray.

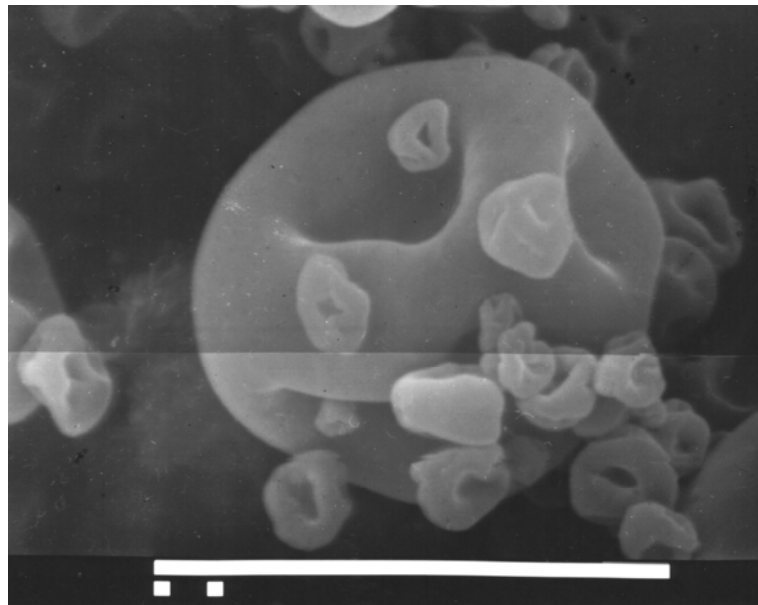


Fig.3.3: Microcápsulas de pigmentos luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante. La barra corresponde a 10 μ m.

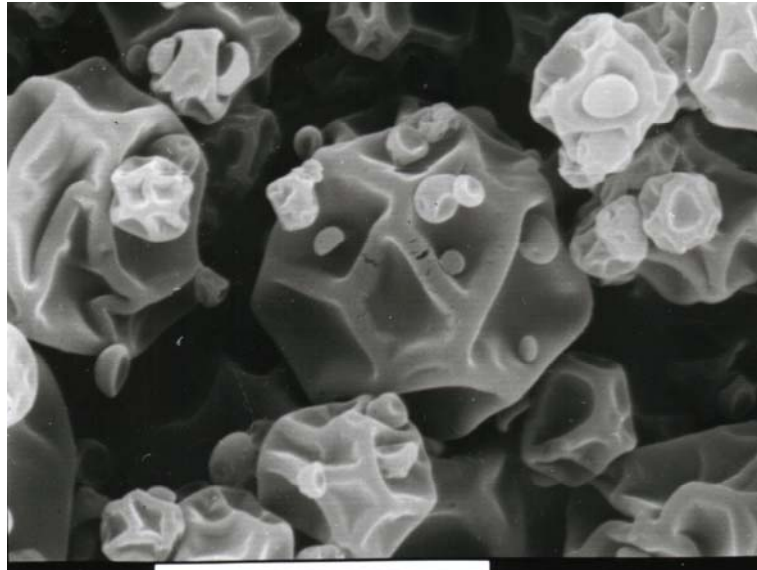


Fig.3.4: Microcápsulas de pigmentos luteína-enocianina utilizando APS como agente encapsulante. La barra corresponde a 10 μm .

La microscopía electrónica de barrido mostró, para ambos encapsulados, una superficie externa lisa, no granular, en forma de esferas irregulares con abolladuras, pero libre de poros y grietas. Esta estructura ha sido observada por Rosenberg y cols. (1985) en microencapsulación de metilantranilato con maltodextrina 10 ED utilizando secado spray. Zgoulli y cols. (1999) revelaron la misma estructura para microencapsulación de claritromicina, con maltodextrina como agente encapsulante. Se postula que las abolladuras pueden ser formadas por la contracción de las partículas durante el secado y enfriado (Rosenberg y cols., 1985). La presencia de abolladuras, si bien tiene un efecto adverso sobre las propiedades de flujo de los encapsulados, para fines de la industria de alimentos esto no es importante.

En las fotografías se observa que las microcápsulas con maltodextrina tienen una forma más esférica que las realizadas con APS, sugiriendo que la maltodextrina tiende a hincharse como sucede con el almidón en el proceso de gelatinización, de acuerdo a lo descrito por Pedroza y cols. (s.a.). Además, se debe considerar que los encapsulados de maltodextrina y APS

se realizaron a pH 10 lo cual podría influir en la conformación del polímero y, por lo tanto, en la forma de su estructura.

En las fotografías electrónicas se observan microcápsulas de diferentes tamaños lo cual muestra la polidiversidad de los agentes encapsulantes (polímeros). Los tamaños de las microcápsulas varían de 1 μm hasta 9,4 μm , para pigmentos encapsulados con maltodextrina (Fig. 3.3), y desde 1,7 μm hasta 10 μm , para los encapsulados con APS (Fig. 3.4), aproximadamente.

3.3 Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados con maltodextrina.

La Tabla 3.1 muestra las medidas de color realizadas a los encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante, durante el almacenamiento a 40, 60 y 80 °C. Estas medidas fueron realizadas con el sistema CIELab, en duplicado. Los valores obtenidos mostraron muy poca dispersión entre ellos (datos no mostrados).

En la tabla 3.1 se observa un aumento del parámetro L* para las tres temperaturas estudiadas, aumentando la claridad de los pigmentos encapsulados con maltodextrina. La temperatura y el tiempo tienen un efecto significativo sobre L* ($p \leq 0,05$) (Anexo 1).

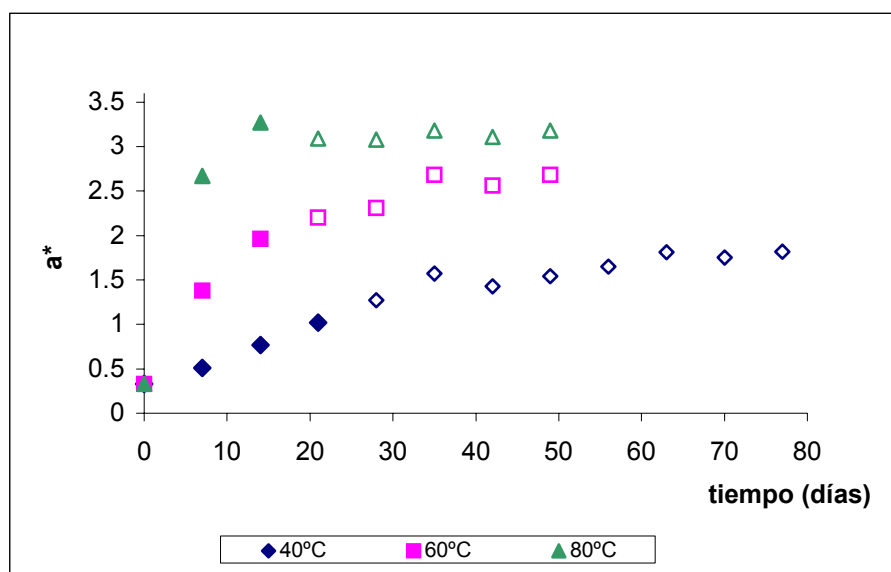


Fig.3.5: Relación entre a* y tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con maltodextrina a 40, 60 y 80°C.

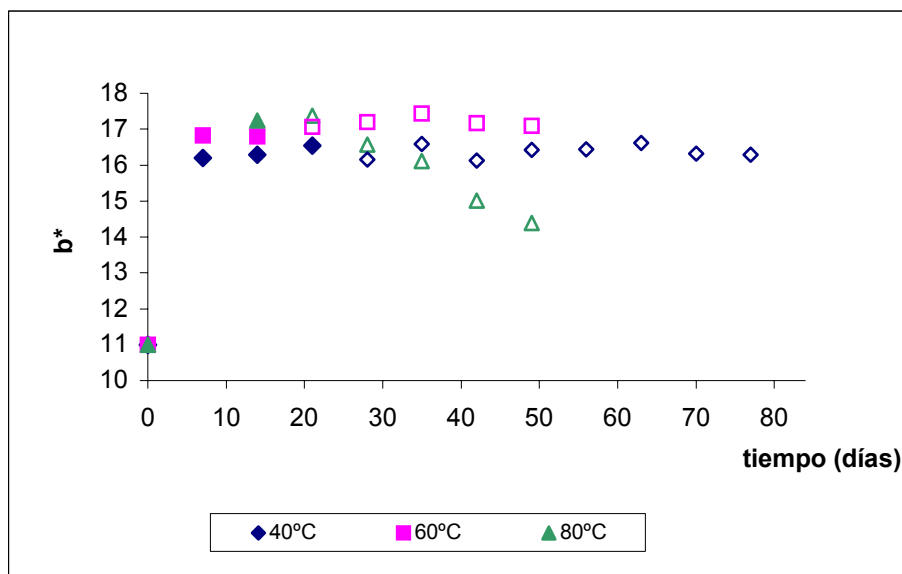


Fig.3.6: Relación entre b* y tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con maltodextrina a 40, 60 y 80°C.

En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestra el comportamiento de a* y b* frente al tiempo de almacenamiento a 40, 60 y 80°C, para los pigmentos encapsulados con maltodextrina.

En la Fig. 3.5 se observa el rápido aumento de a* en las 3 primeras semanas de almacenamiento seguido de una degradación más lenta. La temperatura afecta significativamente este parámetro ($p \leq 0,05$). El test de diferencias múltiples de Tukey indica que a* difiere significativamente entre las 3 temperaturas de estudio (Anexo 1).

Estudios sobre encapsulación de α y β carotenos de zanahoria realizados por Wagner y Warthesen (1995), revelan que no todos los carotenos fueron encapsulados, quedando el 29% en la superficie de las microcápsulas. Estos “carotenos superficiales” están menos protegidos de la oxidación que los carotenos que fueron encapsulados. Por otro lado, mostraron que la degradación de α y β caroteno de zanahoria en ausencia de agente encapsulante ocurre en 4 días a 21°C (Wagner y Warthesen, 1995).

El parámetro b^* presenta un rápido aumento después de la primera semana de almacenamiento (Fig. 3.6), lo cual sugiere que los pigmentos superficiales de luteína se degradan a una mayor velocidad que los pigmentos superficiales de encianina. Los valores de b^* no tienen relación significativa con la temperatura de almacenamiento ($p>0,05$) (Anexo 1).

El valor Hue (tono) relaciona los parámetros a^* y b^* permitiendo tener una medida que incorpora los componentes verde-rojo y amarillo-azul.

La temperatura de almacenamiento presenta un efecto significativo sobre el tono ($p\leq 0,05$). El test de diferencias múltiples de Tukey indica que el tono a 80°C difiere significativamente del tono a 40 y 60°C (Anexo 1).

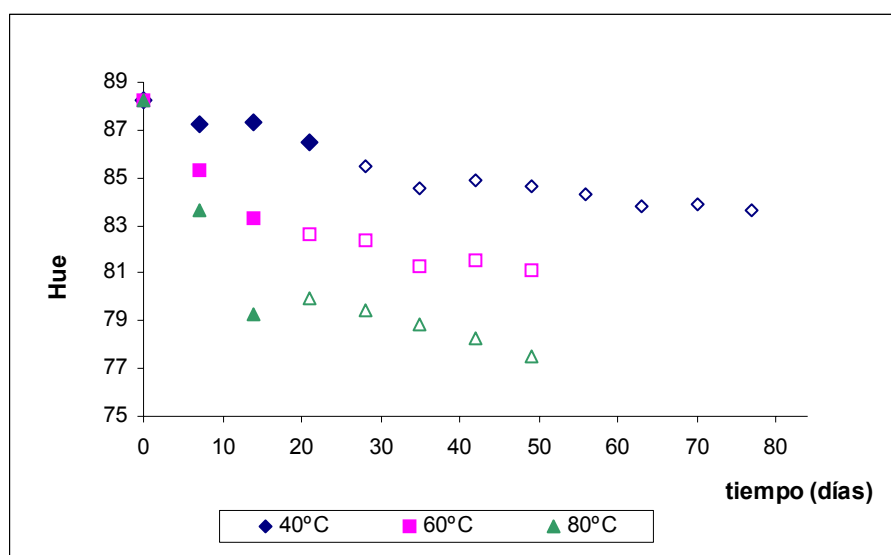


Fig.3.7: Relación entre Hue y tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con maltodextrina a 40, 60 y 80°C .

En la Fig. 3.7 se observa el comportamiento de Hue con respecto al tiempo de almacenamiento a las 3 temperaturas estudiadas. Esta figura muestra una rápida disminución de Hue hasta los 15 días de almacenamiento para las temperaturas de 60 y 80°C , y hasta los 20 días de almacenamiento para 40°C , luego sigue una disminución más lenta, sugiriendo una cinética de degradación diferente entre los pigmentos superficiales y los pigmentos encapsulados.

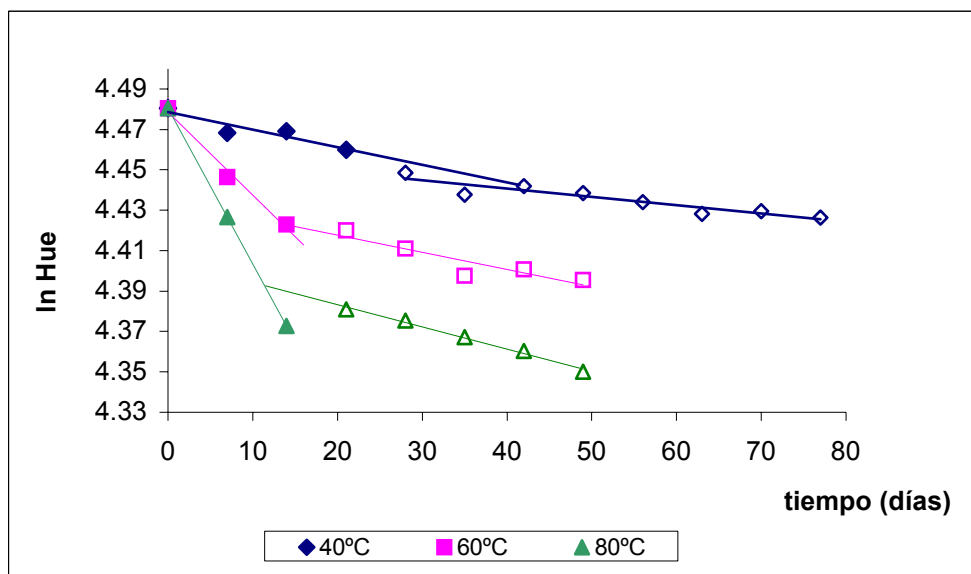


Fig.3.8: Gráfico de degradación de pseudo-primer orden para pigmentos de luteína-encocianina encapsulados con maltodextrina.

En la Fig. 3.8 se presenta el gráfico de ln Hue frente al tiempo de almacenamiento, mostrando cinéticas de pseudo-primer orden para la degradación de los pigmentos superficiales y encapsulados. El coeficiente de correlación (r) fue utilizado como parámetro para determinar el orden de reacción (Anexo 2). Estudios previos muestran que carotenos de zanahoria encapsulados con maltodextrina por secado spray siguen una cinética de degradación de pseudo-primer orden (Wagner y Warthesen, 1995). Resultados similares se encontraron para la degradación de pigmentos de rosa mosqueta encapsulados con almidón y gelatina (Robert y cols., 2003). Cuando los pigmentos no son encapsulados, valores más altos de constante de degradación, del orden de $1,2 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ para β caroteno, reportaron en secado spray de zanahoria almacenados a 21°C (Wagner y Warthesen, 1995).

Tabla 3.1: Parámetros de color de los encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante, durante el almacenamiento a 40, 60 y 80 °C.

T(°C)	L*	a*	b*	tiempo(días)
40°C	43,78	0,33	11,00	0
	42,51	0,51	16,20	7
	51,90	0,77	16,29	14
	51,81	1,02	16,55	21
	52,83	1,27	16,15	28
	51,55	1,57	16,58	35
	53,02	1,43	16,12	42
	53,49	1,54	16,42	49
	53,41	1,65	16,44	56
	51,99	1,81	16,61	63
	52,73	1,75	16,32	70
	52,05	1,82	16,29	77
	60°C	43,78	0,33	11,00
50,52		1,38	16,82	7
51,38		1,96	16,79	14
51,64		2,20	17,07	21
52,52		2,31	17,19	28
51,67		2,68	17,43	35
53,94		2,56	17,17	42
53,19		2,68	17,10	49
80°C		43,78	0,33	11,00
	51,92	2,67	23,98	7
	51,66	3,27	17,24	14
	54,71	3,09	17,37	21
	55,21	3,08	16,57	28
	55,11	3,18	16,11	35
	55,49	3,11	15,01	42
	56,27	3,18	14,39	49

Los valores representan el promedio de dos lecturas ($\pm \xi = 0,02$).

La Tabla 3.2 muestra las constantes de velocidad de degradación (k) de los pigmentos encapsulados con maltodextrina, con su respectivo coeficiente de correlación r.

Tabla 3.2: Constantes de velocidad de degradación (k) y r para los pigmentos encapsulados con maltodextrina.

T (°C)	$K_{obs.(s)}(d^{-1})$	r	$K_{obs.(e)}(d^{-1})$	r
40	$8,6 \times 10^{-4} \pm 2,0 \times 10^{-4}$	0,949	$4,0 \times 10^{-4} \pm 7,7 \times 10^{-5}$	0,901
60	$4,3 \times 10^{-3} \pm 0,0$	1,000	$7,1 \times 10^{-4} \pm 2,2 \times 10^{-4}$	0,884
80	$7,9 \times 10^{-3} \pm 4,1 \times 10^{-4}$	0,999	$1,2 \times 10^{-3} \pm 1,6 \times 10^{-4}$	0,970

* $K_{obs.(s)}$ = constante de velocidad de degradación para los pigmentos superficiales.
 $K_{obs.(e)}$ = constante de velocidad de degradación para los pigmentos encapsulados.
 r = coeficiente de correlación ; d = días

La tabla 3.2 muestra las constantes de velocidad de degradación para los pigmentos superficiales ($k_{(s)}$) y los encapsulados ($k_{(e)}$), obtenidas de la pendiente del gráfico ln Hue frente al tiempo de almacenamiento (días), para las 3 temperaturas estudiadas. Un aumento en la temperatura de almacenamiento produce un aumento significativo de la constante de velocidad de los pigmentos superficiales y encapsulados ($p \leq 0,05$) (Anexo 3). Estudios de estabilidad de carotenos encapsulados realizados por Wagner y Warthesen (1995) y Robert y cols. (2003) revelan una fuerte dependencia entre la constante de velocidad de degradación y la temperatura.

Las constantes de velocidad de los pigmentos superficiales son significativamente mayores ($p \leq 0,05$) (Anexo 3) que las de los pigmentos encapsulados ($k_s > k_e$) a 40, 60 y 80°C, lo que está de acuerdo con su exposición a las condiciones ambientales de oxígeno y humedad que permiten una mayor degradación de estos pigmentos.

Tabla 3.3: Parámetros de Arrhenius y termodinámicos para los pigmentos encapsulados con maltodextrina.

Ea (kcal/mol)	Intercepto Ln A	r	ΔH^\ddagger (kcal/mol)	ΔS^\ddagger (cal/mol$^\circ$K)
5,5	0,968	0,999	8,6	-47,2

La tabla 3.3 muestra los parámetros de Arrhenius y termodinámicos para los pigmentos encapsulados con maltodextrina. La energía de activación (E_a) para los pigmentos encapsulados presentó un valor de 5,5 kcal/mol. La entalpía de activación ΔH^\ddagger y la entropía de activación (ΔS^\ddagger) fueron obtenidas de la pendiente y del intercepto, respectivamente del gráfico de $\ln(k/T)$ frente a $1/T$. La entalpía y entropía de activación para pigmentos de enocianina-luteína encapsulados fue 8,6 y -47,2, respectivamente, valores similares fueron obtenidos por Robert y cols. (2003) para licopeno encapsulado con almidón, 10,2 kcal/mol y -50 (cal/mol $^\circ$ K), respectivamente.

3.4 Estabilidad del color de los pigmentos encapsulados con APS

La Tabla 3.4 muestra las medidas de color realizadas a los encapsulados de luteína-enocianina utilizando APS como agente encapsulante, durante el almacenamiento a 40, 60 y 80 °C.

Tabla 3.4: Parámetros de color de los encapsulados de luteína y enocianina utilizando APS como agente encapsulante, durante el almacenamiento a 40, 60 y 80 °C.

T(°C)	L*	a*	b*	tiempo (días)	
40°C	46,65	1,94	14,65	0	
	53,41	2,40	23,00	7	
	54,24	2,60	23,42	14	
	54,20	2,70	23,25	21	
	54,56	2,71	23,23	28	
	56,37	2,71	23,62	35	
	54,40	2,73	22,75	42	
	55,76	2,61	23,11	49	
	56,16	2,55	22,89	56	
	56,16	2,55	22,89	63	
	55,87	2,54	23,02	70	
	55,40	2,41	22,45	77	
	60°C	46,65	1,94	14,65	0
49,79		2,15	22,37	7	
48,38		2,39	22,01	14	
50,77		2,35	22,36	21	
52,81		2,26	22,42	28	
51,09		2,40	21,56	35	
51,94		2,10	21,38	42	
53,18		1,97	21,25	49	
52,46		2,15	21,38	56	
53,02		1,86	20,46	63	
53,04		1,85	19,84	70	
80°C		46,65	1,94	14,65	0
		54,05	2,90	23,98	7
	48,19	3,38	23,30	14	
	49,11	2,97	22,78	21	
	52,74	2,50	21,98	28	
	51,71	2,20	20,46	35	
	55,13	1,50	17,62	42	
	54,01	1,45	15,64	49	
	55,64	1,43	14,42	56	

Los valores representan el promedio de dos lecturas ($\pm \xi = 0,02$).

El parámetro L^* presenta un leve aumento durante el tiempo de almacenamiento para las tres temperaturas estudiadas, aumentando la claridad de los pigmentos encapsulados con APS. La temperatura y el tiempo presentaron un efecto significativo sobre el parámetro L^* ($p \leq 0,05$) (Anexo 4).

El parámetro a^* y b^* presentan un aumento de sus valores a las 3 temperaturas estudiadas. Sin embargo, la temperatura y el tiempo no tienen un efecto significativo sobre a^* ($p > 0,05$) pero sí sobre b^* ($p \leq 0,05$). Se observa un aumento de los valores de a^* en la primera semana de almacenamiento lo cual sugiere una rápida degradación de los pigmentos superficiales. La relación entre a^* y b^* se refleja en el valor Hue, el cual no presenta diferencias significativas con respecto a la temperatura y tiempo de almacenamiento (Anexo 4).

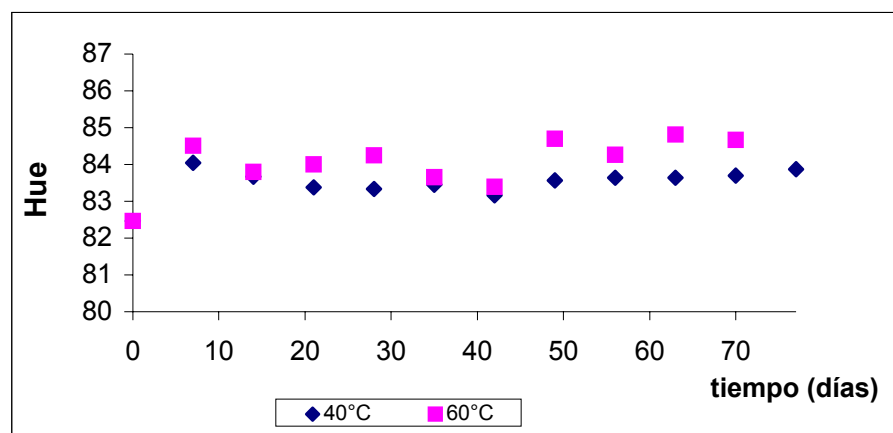


Fig.3.9: Relación entre Hue y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS a 40 y 60°C

En la Fig. 3.9 se muestra el comportamiento Hue frente al tiempo para 40 y 60°C. Se observa un aumento del valor Hue para ambas en la primera semana de almacenamiento y luego los valores se mantienen constantes revelando una gran estabilidad de los pigmentos luteína-enocianina encapsulados con APS.

La Fig. 3.10 muestra el comportamiento de b^* en el tiempo de los pigmentos luteína-enocianina almacenados a 80°C.

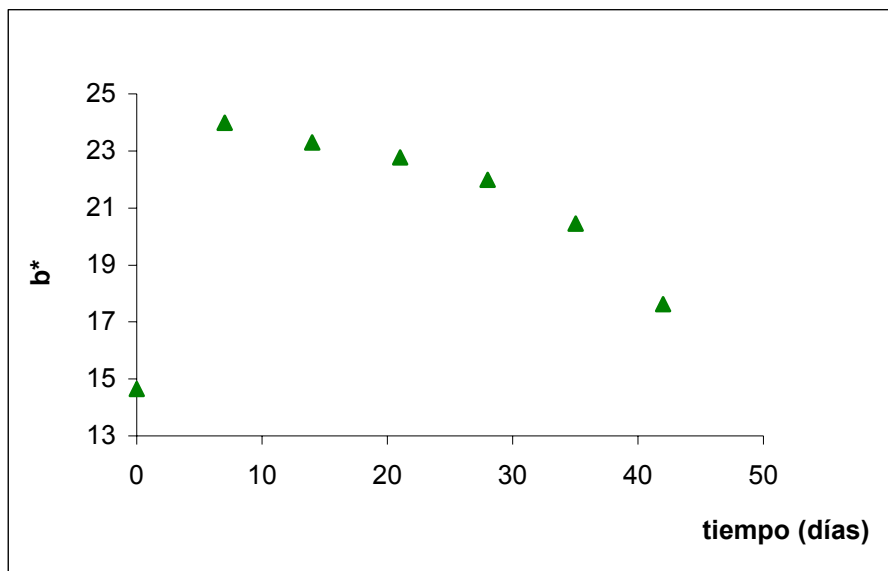


Fig.3.10: Relación entre b^* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos luteína-enocianina encapsulados con APS a 80°C.

En la Fig. 3.10 se muestra la relación de b^* frente al tiempo de almacenamiento para 80°C. Los valores de b^* presentan una disminución desde el día 7 disminuyendo en color amarillo. Petrucelli y Añón (1996) estudiaron los efectos de la temperatura y del pH sobre los APS revelando que a altos valores de pH la proteína de soja aumenta su hidrofobicidad. De acuerdo a esto, se sugiere que la luteína se situaría en el exterior de las proteínas, interaccionando con sus grupos hidrófobos, quedando más expuesta, y la enocianina se situaría en el compartimento más hidrofílico, presentando una mayor protección. Esto se refleja en la degradación de la luteína indicada por la disminución de b^* y, como se aprecia en la Tabla 3.4, los valores de a^* disminuyen a 80°C, aumentando el color verde.

3.5 Estabilidad de los pigmentos encapsulados en la crema

Debido a que todas las tonalidades de color verde presentadas en el estudio de Focus Group fueron aceptadas de igual forma, se seleccionó la de concentración media para el estudio de estabilidad de color en un alimento, correspondiendo a 0,02 gramos de encapsulado de luteína-enocianina/gramo de crema.

Tabla 3.5: Parámetros de color de los encapsulados de luteína y enocianina aplicados en crema de leche almacenada a 5°C.

L*	a*	b*	tiempo(días)
57,67	2,74	24,79	0
59,35	3,56	26,01	7
58,86	3,94	26,91	14
58,00	4,20	27,38	21
56,63	4,77	28,46	33

Los valores representan el promedio de dos lecturas

En la Tabla 3.5 se presentan los parámetros de color de los pigmentos encapsulados aplicados en crema. El tiempo de almacenamiento presenta un efecto significativo sobre los parámetros L*, a* y b* ($p \leq 0,05$) (Anexo 5). Sin embargo, la crema mantuvo su color en buenas condiciones durante todo el periodo de estudio del alimento. La adición de los encapsulados de luteína-enocianina con APS a la crema, prácticamente se ven inalterados, mostrando así su aplicabilidad en alimentos.

Las Figs. 3.10 y 3.11 muestran el comportamiento de los pigmentos encapsulados con APS aplicados a la crema, en relación con los parámetros de color a* y b*.

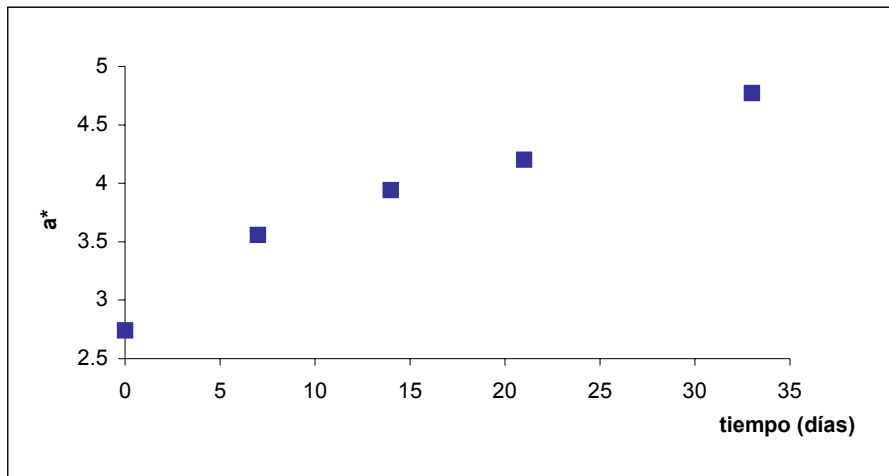


Fig.3.11: Relación entre a* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS aplicados en crema espesa.

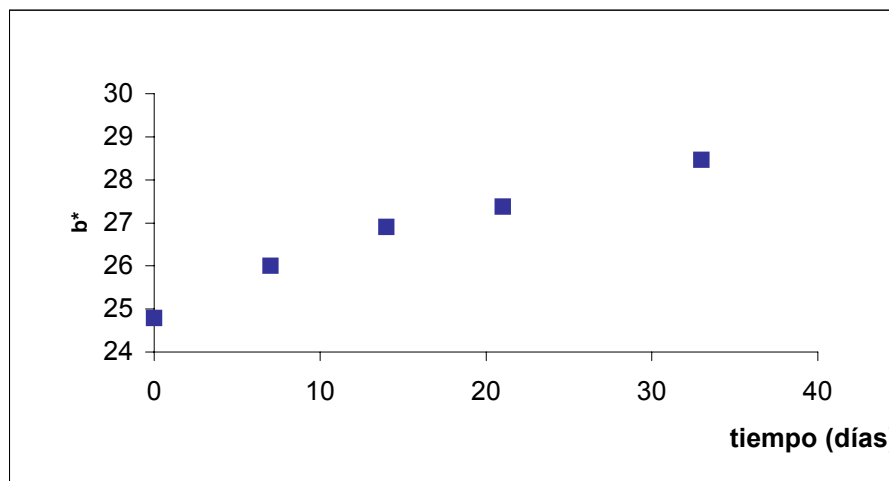


Fig.3.12: Relación entre b* y el tiempo de almacenamiento para los pigmentos encapsulados con APS aplicados en crema espesa.

Las Figuras 3.11 y 3.12 presentan el comportamiento de a* y b* frente al tiempo de almacenamiento, graficando el comportamiento anteriormente descrito.

3.6 Evaluación sensorial: Focus Group

La Fig. 3.12 muestra las tres tonalidades presentadas en el estudio de focus Group, utilizadas en el estudio de Focus Group.



Fig.3.13: Tonalidades presentadas en el estudio de Focus Group. Las concentraciones utilizadas son: A (0,05), B (0,02) y C (0,01) expresadas en gramos de pigmentos encapsulados en APS/gramo de crema de leche.

La Tabla 3.6 muestra las opiniones de los participantes para las tres tonalidades verdes. El detalle de los resultados se muestra en el Anexo 6.

Tabla 3.6: Resumen de las opiniones obtenidas del Focus Group.

Tonalidad	Alimento al que se relacionó la tonalidad
A	Esta tonalidad se asoció principalmente a cremas y pastas de intenso color verde. Fue la de menor aceptación por parte de los participantes.
B	Fue asociada principalmente a alimentos colados.
C	Esta tonalidad fue la de mejor aceptación por los participantes. Fue asociada a salsas, helados y mayonesa.

*Concentración: A = 0,05 ; B = 0,02 ; C = 0,01 (gramos de pigmentos encapsulados en APS/gramo de crema de leche)

La Tabla 3.6 muestra el resumen de las opiniones de los participantes del Focus Group. Este estudio fue realizado en 3 sesiones de acuerdo a la metodología descrita en el punto 2.2.8. Los alimentos más recurrentes para el uso de éstas tonalidades fueron los colados para niños y las cremas de espárragos y espinacas. Sin embargo, las 3 tonalidades presentadas fueron asociadas a alimentos existentes en el mercado surgiendo, además, nuevas aplicaciones como colorantes de productos innovadores helados de manjar-pistacho, salsas decorativas, entre otros (Anexo 6).

Capítulo IV

CONCLUSIONES

Se logró obtener un colorante verde natural producto de la mezcla de luteína y encocianina encapsulado con maltodextrina y APS.

El comportamiento cinético de los pigmentos luteína-encocianina encapsulados con maltodextrina revela la existencia de pigmentos superficiales, los cuales se degradan a una mayor velocidad respecto de los encapsulados. La degradación, tanto para pigmentos superficiales como para los encapsulados, siguió una cinética de pseudo-primer orden.

La microscopía electrónica de barrido revela que el tamaño de las encapsulados obtenidos varían desde $1\mu\text{m}$ hasta $9,4\mu\text{m}$ para maltodextrina, y desde $1,7\mu\text{m}$ hasta $10\mu\text{m}$ para APS, aproximadamente.

El agente encapsulante APS presentó una menor degradación de pigmentos luteína-encocianina durante el tiempo de almacenamiento con respecto a la maltodextrina.

Los pigmentos de luteína-encocianina encapsulados con APS aplicados a crema de leche, presentaron una alta estabilidad manteniendo el color verde durante todo el periodo de estudio (30 días a 5°C).

El estudio de Focus Group reveló que las tres tonalidades presentadas son aplicables a alimentos existentes en el mercado (pastas, colados, sopas y cremas) y a productos innovadores (helados de pistacho-manjar y salsas decorativas).

BIBLIOGRAFÍA

ARANCIBIA, A. Farmacotecnia Teórica y Práctica. Compañía Editorial Continental, S.A., México. Tomo VI, Cáp.49: 1793-1805, 1981

CALVO, C. El color en los Alimentos, Medidas Instrumentales. Publicación miscelánea agrícola 31. Universidad de Chile, 1989.

CARRASCO, R. Evaluación sensorial e instrumental del color verde obtenido por colorantes naturales en emulsiones. Determinación de su posible uso en alimentos. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2004.

CASTELLÁN, G. Fisicoquímica. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, S.A, 2° Edición, 1987.

DAYDÉ, J. Mejoramiento Varietal de la Soja para la Valorización de sus Proteínas en Alimentación Humana. Aceites y Grasas, Sept.: 391-395, 2000.

DZIEZAK, J. Microencapsulation and Encapsulated Ingredients. Food Technology. 42:136-151, 1988.

FENNEMA, O. Química de los Alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A., 2°Edición, 1993.

KUNTZ, L. 1997 Making the Most of Maltodextrins.

<<http://www.foodproductdesign.com/archive/1997/0897DE.html>>

LUZZI, L. Microencapsulation. J. Pharmaceutical Sci. 59(10): 1367-1376, 1970

MARIOTTI, F. y TOMÉ, D. Las Propiedades Nutricionales de las Proteínas Vegetales en la Alimentación Humana. Aceites y Grasas, Dic.: 513-524, 2000.

PEDROZA, R. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México, 2002.

PEDROZA, I., VERNON, E., DURÁN, M., y CHÁVEZ, M. Situación actual de los alimentos microencapsulados para larvas de crustáceos y presentación de un problema tipo utilizando polisacáridos como agentes encapsulantes. Avances en nutrición acuícola III. Universidad autónoma de México, (s.a.).

PETRUCCELLI, S. y AÑÓN, M. pH Induced Modifications in the Thermal Stability of Soybean. J. Agric. Food Chem, 44:3005-3009, 1996.

ROBERT, P., CARLSSON, R. M., ROMERO, N., y MASSON, L. Stability of Spray-Dried Encapsulated Carotenoid Pigments from Rosa Mosqueta (Rosa rubiginosa) Oleoresin. JAOCs, 80 (11), 1115-1120, 2003.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, 2000.

RODRÍGUEZ, M. 2002. El color en los alimentos.

<http://www.consumaseguridad.com>

ROSENBERG, M., KOPELMAN, I y TALMON, Y. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. J. Of Food Sci. , 50:139-144, 1985.

SAFONT, S. 2004. La Luteína. < <http://www.retinosis.org>>

SILVA, S. Luteína, alimento para tu vista. Food Ingredients: 80-81, 2004.

SCHWARTZ, M. y MUÑOZ, O. Antocianina: Colorante Natural. Revista Industria de Alimentos. Sept/Oct.: 16-20, 2003.

SZEKIETA, R. Argentina agroalimentaria, un país para descubrir y visitar. Periódico empresario. Año 6, 102: 13-14, 2003.

WAGNER, L. y WARTHESEN, J. Stability of Spray-Dried Encapsulated Carrot Carotenes. J. Food Sci. 60:1048-1053, 1995.

ZGOULLI, S., GREK, V., BARRE, G., GOFFINET, G., THONART, PH. y ZINNER, S. Microencapsulation of Erytromycin and Clarithomycin Using a Spray-Drying Technique. J. Microencapsulation, 16, 5:565-571.

ANEXO 1

ANOVA de tres vías para los encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante.

Multifactor ANOVA - L

Analysis of Variance for L - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

MAIN EFFECTS					
A:temp	35.0688	2	17.5344	5.58	0.0165
B:tiempo	292.631	11	26.6028	8.47	0.0002
RESIDUAL	43.9683	14	3.14059		

TOTAL (CORRECTED)	360.342	27			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of L into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on L at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for L
with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit

GRAND MEAN	28	52.2146			
temp					
40	12	50.9225	0.511582	49.8253	52.0197
60	8	51.8913	0.723486	50.3395	53.443
80	8	53.83	0.723486	52.2783	55.3817
tiempo					
0	3	43.78	1.02316	41.5855	45.9745
7	3	48.3167	1.02316	46.1222	50.5111
14	3	51.6467	1.02316	49.4522	53.8411
21	3	52.72	1.02316	50.5255	54.9145
28	3	53.52	1.02316	51.3255	55.7145
35	3	52.7767	1.02316	50.5822	54.9711
42	3	54.15	1.02316	51.9555	56.3445
49	3	54.3167	1.02316	52.1222	56.5111
56	1	54.7021	1.84454	50.7459	58.6582
63	1	53.2821	1.84454	49.3259	57.2382
70	1	54.0221	1.84454	50.0659	57.9782
77	1	53.3421	1.84454	49.3859	57.2982

The StatAdvisor

This table shows the mean L for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for L by temp

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
temp	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
40	12	50.9225	X
60	8	51.8913	XX
80	8	53.83	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
40 - 60	-0.96875		2.12519
40 - 80	*-2.9075		2.12519
60 - 80	-1.93875		2.32803

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

Multifactor ANOVA - a

Analysis of Variance for a - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:temp	11.4114	2	5.70568	37.62	0.0000
B:tiempo	12.2076	11	1.10978	7.32	0.0004
RESIDUAL	2.12331	14	0.151665		
TOTAL (CORRECTED)	24.5348	27			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

 The ANOVA table decomposes the variability of a into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on a at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for a
 with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	28	2.16958			
temp					
40	12	1.28917	0.112422	1.04804	1.53029
60	8	2.24667	0.158989	1.90567	2.58766
80	8	2.97292	0.158989	2.63192	3.31391
tiempo					
0	3	0.33	0.224844	-0.152244	0.812244
7	3	1.52	0.224844	1.03776	2.00224
14	3	2.0	0.224844	1.51776	2.48224
21	3	2.10333	0.224844	1.62109	2.58558
28	3	2.22	0.224844	1.73776	2.70224
35	3	2.47667	0.224844	1.99442	2.95891
42	3	2.36667	0.224844	1.88442	2.84891
49	3	2.46667	0.224844	1.98442	2.94891
56	1	2.53042	0.405344	1.66104	3.39979
63	1	2.69042	0.405344	1.82104	3.55979
70	1	2.63042	0.405344	1.76104	3.49979
77	1	2.70042	0.405344	1.83104	3.56979

The StatAdvisor

 This table shows the mean a for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for a by temp

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
temp	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
40	12	1.28917	X
60	8	2.24667	X
80	8	2.97292	X

Contrast	Difference	+/- Limits
40 - 60	*-0.9575	0.467019
40 - 80	*-1.68375	0.467019
60 - 80	*-0.72625	0.511594

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

 This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of

means. An asterisk has been placed next to 3 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 3 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

Multifactor ANOVA - b

Analysis of Variance for b - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	110.564	11	10.0513	3.27	0.0201
B:temp	2.88863	2	1.44432	0.47	0.6347
RESIDUAL	43.052	14	3.07515		
TOTAL (CORRECTED)	155.244	27			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of b into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since one P-value is less than 0.05, this factor has a statistically significant effect on b at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for b
with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	28	16.3983			
tiempo					
0	3	11.0	1.01245	8.82851	13.1715
7	3	19.0	1.01245	16.8285	21.1715
14	3	16.7733	1.01245	14.6018	18.9448
21	3	16.9967	1.01245	14.8252	19.1682
28	3	16.6367	1.01245	14.4652	18.8082
35	3	16.7067	1.01245	14.5352	18.8782
42	3	16.1	1.01245	13.9285	18.2715
49	3	15.97	1.01245	13.7985	18.1415
56	1	16.9242	1.82521	13.0095	20.8389
63	1	17.0942	1.82521	13.1795	21.0089
70	1	16.8042	1.82521	12.8895	20.7189
77	1	16.7742	1.82521	12.8595	20.6889
temp					
40	12	15.9142	0.506223	14.8284	16.9999
60	8	16.5717	0.715908	15.0362	18.1071
80	8	16.7092	0.715908	15.1737	18.2446

The StatAdvisor

This table shows the mean b for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for b by temp

```
-----  
Method: 95.0 percent Tukey HSD  
temp      Count      LS Mean      Homogeneous Groups  
-----  
40         12         15.9142      X  
60          8         16.5717      X  
80          8         16.7092      X  
-----  
Contrast          Difference      +/- Limits  
-----  
40 - 60          -0.6575      2.10293  
40 - 80          -0.795       2.10293  
60 - 80          -0.1375      2.30364  
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95.0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

Multifactor ANOVA - hue

Analysis of Variance for hue - Type III Sums of Squares

```
-----  
Source          Sum of Squares      Df      Mean Square      F-Ratio      P-Value  
-----  
MAIN EFFECTS  
A:tiempo          183.867          11         16.7152          31.18          0.0000  
B:temp            35.2947           2          17.6473          32.92          0.0000  
RESIDUAL          7.50477          14          0.536055  
-----  
TOTAL (CORRECTED) 219.196           27  
-----
```

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

 The ANOVA table decomposes the variability of hue into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on hue at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for hue

with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	28	81.5267			
tiempo					
0	3	88.28	0.422711	87.3734	89.1866
7	3	84.7567	0.422711	83.85	85.6633
14	3	81.98	0.422711	81.0734	82.8866
21	3	81.7433	0.422711	80.8367	82.65
28	3	81.39	0.422711	80.4834	82.2966
35	3	80.45	0.422711	79.5434	81.3566
42	3	80.4433	0.422711	79.5367	81.35
49	3	79.9067	0.422711	79.0	80.8133
56	1	80.0125	0.762054	78.3781	81.6469
63	1	79.8025	0.762054	78.1681	81.4369
70	1	79.8825	0.762054	78.2481	81.5169
77	1	79.6725	0.762054	78.0381	81.3069
temp					
40	12	82.3842	0.211356	81.9309	82.8375
60	8	82.3842	0.298902	81.7431	83.0252
80	8	79.8117	0.298902	79.1706	80.4527

The StatAdvisor

 This table shows the mean hue for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for hue by temp

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
temp	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
80	8	79.8117	X
60	8	82.3842	X
40	12	82.3842	X

Contrast	Difference	+/- Limits
40 - 60	0.0	0.878004
40 - 80	*2.5725	0.878004
60 - 80	*2.5725	0.961805

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

ANEXO 2

Análisis de regresión simple para los pigmentos superficiales y encapsulados de luteína-enocianina utilizando maltodextrina como agente encapsulante.

Análisis para los pigmentos superficiales:

Simple Regression - ln Hue vs. tiempo (40°C)

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: ln Hue
Independent variable: tiempo

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.479	0.00264575	1692.9	0.0000
Slope	-0.000857143	0.000202031	-4.24264	0.0513

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00018	1	0.00018	18.00	0.0513
Residual	0.00002	2	0.00001		
Total (Corr.)	0.0002	3			

Correlation Coefficient = -0.948683
R-squared = 90.0 percent
Standard Error of Est. = 0.00316228

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between ln Hue and tiempo. The equation of the fitted model is

$$\ln \text{ Hue} = 4.479 - 0.000857143 \cdot \text{tiempo}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.10, there is a statistically significant relationship between ln Hue and tiempo at the 90% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 90.0% of the variability in ln Hue. The correlation coefficient equals -0.948683, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00316228. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Simple Regression - ln Hue vs. tiempo (60°C)

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: ln Hue
Independent variable: tiempo

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.48	0.0		
Slope	-0.00428571	0.0		

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.0018	1	0.0018		
Residual	0.0	1	0.0		
Total (Corr.)	0.0018	2			

Correlation Coefficient = -1.0
R-squared = 100.0 percent
Standard Error of Est. = 0.0

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between ln Hue and tiempo. The equation of the fitted model is

$$\ln \text{ Hue} = 4.48 - 0.00428571 \cdot \text{tiempo}$$

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 100.0% of the variability in ln Hue. The correlation coefficient equals -1.0, indicating a relatively strong relationship between the

Simple Regression - ln Hue vs. tiempo (80°C)

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: ln Hue
Independent variable: tiempo

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.48167	0.00372678	1202.56	0.0005
Slope	-0.00785714	0.000412393	-19.0526	0.0334

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00605	1	0.00605	363.00	0.0334
Residual	0.0000166667	1	0.0000166667		
Total (Corr.)	0.00606667	2			

Correlation Coefficient = -0.998625
R-squared = 99.7253 percent
Standard Error of Est. = 0.00408248

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between ln Hue and tiempo. The equation of the fitted model is

$$\ln \text{ Hue} = 4.48167 - 0.00785714 * \text{tiempo}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.05, there is a statistically significant relationship between ln Hue and tiempo at the 95% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99.7253% of the variability in ln Hue. The correlation coefficient equals -0.998625, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00408248. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Análisis para los pigmentos encapsulados:

Simple Regression - ln Hue vs. tiempo (40°C)

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b * X$

Dependent variable: ln Hue
Independent variable: tiempo

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.45679	0.00420981	1058.67	0.0000
Slope	-0.000391156	0.0000766879	-5.10063	0.0022

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.000314881	1	0.000314881	26.02	0.0022
Residual	0.000072619	6	0.0000121032		
Total (Corr.)	0.0003875	7			

Correlation Coefficient = -0.901441
R-squared = 81.2596 percent
Standard Error of Est. = 0.00347896

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between ln Hue and tiempo. The equation of the fitted model is

$$\ln \text{ Hue} = 4.45679 - 0.000391156 * \text{tiempo}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between ln Hue and tiempo at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 81.2596% of the variability in ln Hue. The correlation coefficient equals -0.901441, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00347896. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Simple Regression - ln Hue vs. tiempo (60°C)

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

 Dependent variable: ln Hue
 Independent variable: tiempo

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.431	0.00793725	558.254	0.0000
Slope	-0.000714286	0.000218218	-3.27327	0.0467

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00025	1	0.00025	10.71	0.0467
Residual	0.00007	3	0.0000233333		
Total (Corr.)	0.00032	4			

Correlation Coefficient = -0.883883
 R-squared = 78.125 percent
 Standard Error of Est. = 0.00483046

The StatAdvisor

 The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between ln Hue and tiempo. The equation of the fitted model is

$$\ln \text{ Hue} = 4.431 - 0.000714286 \cdot \text{tiempo}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.05, there is a statistically significant relationship between ln Hue and tiempo at the 95% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 78.125% of the variability in ln Hue. The correlation coefficient equals -0.883883, indicating a moderately strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00483046. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Simple Regression - ln Hue vs. Tiempo (80°C)

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

 Dependent variable: ln Hue
 Independent variable: tiempo

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	4.408	0.006	734.667	0.0000
Slope	-0.00115286	0.000164957	-6.9282	0.0062

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00064	1	0.00064	48.00	0.0062
Residual	0.00004	3	0.0000133333		
Total (Corr.)	0.00068	4			

Correlation Coefficient = -0.970143
R-squared = 94.1176 percent
Standard Error of Est. = 0.00365148

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between ln Hue and tiempo. The equation of the fitted model is

$$\ln \text{ Hue} = 4.408 - 0.00114286 * \text{tiempo}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between ln Hue and tiempo at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 94.1176% of the variability in ln Hue. The correlation coefficient equals -0.970143, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00365148. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

ANEXO 3

Análisis comparativo de las constantes de velocidad degradación de los pigmentos superficiales (ks) y encapsulados (ke), utilizando maltodextrina como agente encapsulante.

Two-Sample Comparison - ks & ke

Analysis Summary

Sample 1: ks
Sample 2: ke

Sample 1: 3 values ranging from 0.0009 to 0.0079
Sample 2: 3 values ranging from 0.0004 to 0.0012

The StatAdvisor

This procedure is designed to compare two samples of data. It will calculate various statistics and graphs for each sample, and it will run several tests to determine whether there are statistically significant differences between the two samples.

Summary Statistics

	ks	ke
Count	3	3
Average	0.0046	0.000766667
Variance	0.00001237	1.63333E-7
Standard deviation	0.0035171	0.000404145
Minimum	0.0009	0.0004
Maximum	0.0079	0.0012
Range	0.007	0.0008
Std. skewness	-0.357206	0.510608
Std. kurtosis		

The StatAdvisor

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant. Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the tests which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. To calculate the standardized kurtosis, press the alternate mouse button and select Pane Options.

The StatAdvisor

This option runs an F-test to compare the variances of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each standard deviation and for the ratio of the variances. Of particular interest is the confidence interval for the ratio of the variances, which extends from 1.94192 to 2953.65. Since the interval does not contain the value 1.0, there is a statistically significant difference between the standard deviations of the two samples at the 95.0% confidence level.

An F-test may also be used to test a specific hypothesis about the standard deviations of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the ratio of the standard deviations equals 1.0 versus the alternative hypothesis that the ratio does not equal 1.0. Since the computed P-value is less than 0.05, we can reject the null hypothesis in favor of the alternative.

IMPORTANT NOTE: the F-tests and confidence intervals shown here depend on the samples having come from normal distributions. To test this assumption, select Summary Statistics from the list of Tabular Options and check the standardized skewness and standardized kurtosis values.

Comparison of Medians

Median of sample 1: 0.005
Median of sample 2: 0.0007

Mann-Whitney (Wilcoxon) W test to compare medians

Null hypothesis: median1 = median2
Alt. hypothesis: median1 NE median2

Average rank of sample 1: 4.66667
Average rank of sample 2: 2.33333

W = 1.0 P-value = 0.19043

The StatAdvisor

This option runs a Mann-Whitney W test to compare the medians of the two samples. This test is constructed by combining the two samples, sorting the data from smallest to largest, and comparing the average ranks of the two samples in the combined data. Since the P-value is greater than or equal to 0.05, there is not a statistically significant difference between the medians at the 95.0% confidence level.

ANEXO 4

ANOVA de tres vías para los encapsulados de luteína-enocianina utilizando APS como agente encapsulante.

Multifactor ANOVA - L

Analysis of Variance for L - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:temperatura	55.868	2	27.934	13.73	0.0002
B:tiempo	169.117	11	15.3743	7.56	0.0001
RESIDUAL	36.6222	18	2.03457		
TOTAL (CORRECTED)	271.982	31			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of L into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on L at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for L

with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	32	52.7019			
temperatura					
40	12	54.4317	0.411761	53.5666	55.2967
60	11	51.2817	0.447631	50.3412	52.2221
80	9	52.3922	0.511886	51.3168	53.4677
tiempo					
0	3	46.65	0.823522	44.9198	48.3802
7	3	52.4167	0.823522	50.6865	54.1468
14	3	50.27	0.823522	48.5398	52.0002
21	3	51.36	0.823522	49.6298	53.0902
28	3	53.37	0.823522	51.6398	55.1002
35	3	53.0567	0.823522	51.3265	54.7868
42	3	53.8233	0.823522	52.0932	55.5535
49	3	54.3167	0.823522	52.5865	56.0468
56	3	54.7533	0.823522	53.0232	56.4835
63	2	54.4352	1.02711	52.2773	56.5931
70	2	54.3002	1.02711	52.1423	56.4581
77	1	53.6702	1.4713	50.5791	56.7613

The StatAdvisor

This table shows the mean L for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for L by temperatura

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
temperatura	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
60	11	51.2817	X
80	9	52.3922	X
40	12	54.4317	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
40 - 60	*3.15		1.52029
40 - 80	*2.03944		1.606
60 - 80	-1.11056		1.63699

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

Multifactor ANOVA - a

Analysis of Variance for a - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:temperatura	1.05343	2	0.526715	3.43	0.0546
B:tiempo	2.43753	11	0.221594	1.44	0.2359
RESIDUAL	2.76134	18	0.153408		
TOTAL (CORRECTED)	6.20849	31			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

 The ANOVA table decomposes the variability of a into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0.05, none of the factors have a statistically significant effect on a at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for a
 with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	32	2.28824			
temperatura					
40	12	2.5375	0.113066	2.29996	2.77504
60	11	2.1175	0.122916	1.85926	2.37574
80	9	2.20972	0.14056	1.91442	2.50503
tiempo					
0	3	1.94	0.226132	1.46491	2.41509
7	3	2.48333	0.226132	2.00825	2.95842
14	3	2.79	0.226132	2.31491	3.26509
21	3	2.67333	0.226132	2.19825	3.14842
28	3	2.49	0.226132	2.01491	2.96509
35	3	2.43667	0.226132	1.96158	2.91175
42	3	2.11	0.226132	1.63491	2.58509
49	3	2.01	0.226132	1.53491	2.48509
56	3	2.04333	0.226132	1.56825	2.51842
63	2	2.16574	0.282037	1.5732	2.75828
70	2	2.15574	0.282037	1.5632	2.74828
77	1	2.16074	0.404007	1.31195	3.00953

The StatAdvisor

 This table shows the mean a for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for a by temperatura

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
temperatura	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
60	11	2.1175	X
80	9	2.20972	XX
40	12	2.5375	X

Contrast	Difference	+/- Limits
40 - 60	*0.42	0.417459
40 - 80	0.327778	0.440996
60 - 80	-0.0922222	0.449504

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

 This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of

means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

Multifactor ANOVA - b

Analysis of Variance for b - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:temperatura	40.9543	2	20.4771	6.03	0.0099
B:tiempo	174.001	11	15.8183	4.66	0.0020
RESIDUAL	61.1155	18	3.39531		
TOTAL (CORRECTED)	279.652	31			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of b into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on b at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for b with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	32	20.8885			
temperatura					
40	12	22.3567	0.531923	21.2391	23.4742
60	11	20.8885	0.578261	19.6736	22.1034
80	9	19.4204	0.661267	18.0311	20.8096
tiempo					
0	3	14.65	1.06385	12.4149	16.8851
7	3	23.1167	1.06385	20.8816	25.3517
14	3	22.91	1.06385	20.6749	25.1451
21	3	22.7967	1.06385	20.5616	25.0317
28	3	22.5433	1.06385	20.3083	24.7784
35	3	21.88	1.06385	19.6449	24.1151
42	3	20.5833	1.06385	18.3483	22.8184
49	3	20.0	1.06385	17.7649	22.2351
56	3	19.5633	1.06385	17.3283	21.7984
63	2	20.9409	1.32685	18.1533	23.7285
70	2	20.6959	1.32685	17.9083	23.4835
77	1	20.9818	1.90066	16.9887	24.975

The StatAdvisor

This table shows the mean b for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for b by temperatura

Method: 95.0 percent Tukey HSD

temperatura	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
80	9	19.4204	X
60	11	20.8885	XX
40	12	22.3567	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
40 - 60	1.46818	1.96395	
40 - 80	*2.93631	2.07468	
60 - 80	1.46813	2.11471	

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

Multifactor ANOVA - hue

Analysis of Variance for hue - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:temperatura	2.04356	2	1.02178	2.35	0.1240
B:tiempo	8.91664	11	0.810604	1.86	0.1162
RESIDUAL	7.82774	18	0.434875		
TOTAL (CORRECTED)	18.9491	31			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of hue into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is

measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0.05, none of the factors have a statistically significant effect on hue at the 95.0% confidence level.

Table of Least Squares Means for hue
with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Mean	Std. Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	32	83.7325			
temperatura					
40	12	83.4925	0.190367	83.0926	83.8924
60	11	84.0789	0.206951	83.6441	84.5137
80	9	83.6262	0.236657	83.129	84.1234
tiempo					
0	3	82.46	0.380734	81.6601	83.2599
7	3	83.8833	0.380734	83.0834	84.6832
14	3	83.0733	0.380734	82.2734	83.8732
21	3	83.3167	0.380734	82.5168	84.1166
28	3	83.6967	0.380734	82.8968	84.4966
35	3	83.6533	0.380734	82.8534	84.4532
42	3	83.8933	0.380734	83.0934	84.6932
49	3	84.32	0.380734	83.5201	85.1199
56	3	84.08	0.380734	83.2801	84.8799
63	2	84.1719	0.474858	83.1742	85.1695
70	2	84.1319	0.474858	83.1342	85.1295
77	1	84.11	0.680217	82.6809	85.5391

The StatAdvisor

This table shows the mean hue for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Multiple Range Tests for hue by temperatura

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
temperatura	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
40	12	83.4925	X
80	9	83.6262	X
60	11	84.0789	X
Contrast		Difference	+/- Limits
40 - 60		-0.586364	0.702865
40 - 80		-0.133737	0.742494
60 - 80		0.452626	0.75682

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95.0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which

there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0. NOTE: the intervals are not exact since the number of observations at each level is not the same. You might consider using the Bonferroni procedure instead.

ANEXO 5

ANOVA de una vía para los encapsulados de luteína-enocianina con APS aplicados a crema de leche.

One-Way ANOVA - L by tiempo

ANOVA Table for L by tiempo

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	8.8207	4	2.20518	8167.31	0.0000
Within groups	0.00135	5	0.00027		
Total (Corr.)	8.82205	9			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of L into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 8167.31, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean L from one level of tiempo to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Table of Means for L by tiempo
with 95.0 percent LSD intervals

tiempo	Count	Mean	Std. error (pooled s)	Lower limit	Upper limit
0	2	57.68	0.011619	57.6589	57.7011
7	2	59.335	0.011619	59.3139	59.3561
14	2	58.855	0.011619	58.8339	58.8761
21	2	58.015	0.011619	57.9939	58.0361
33	2	56.64	0.011619	56.6189	56.6611
Total	10	58.105			

The StatAdvisor

This table shows the mean L for each level of tiempo. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The standard error is formed by dividing the pooled standard deviation by the square root of the number of observations at each level. The table also displays an interval around each mean. The intervals currently displayed are based on Fisher's least significant difference (LSD) procedure. They are constructed in such a way that if two means are the same, their intervals will overlap 95.0% of the time. You can display the intervals graphically by selecting Means Plot from the list of Graphical Options. In the Multiple Range Tests, these intervals are used to determine which means are significantly different from which others.

Multiple Range Tests for L by tiempo

```
-----
Method: 95.0 percent Tukey HSD
tiempo      Count      Mean      Homogeneous Groups
-----
33           2          56.64      X
0            2          57.68      X
21           2          58.015     X
14           2          58.855     X
7            2          59.335     X
-----
```

```
-----
Contrast      Difference      +/- Limits
-----
0 - 7          *-1.655         0.065614
0 - 14         *-1.175         0.065614
0 - 21         *-0.335         0.065614
0 - 33         *1.04           0.065614
7 - 14         *0.48           0.065614
7 - 21         *1.32           0.065614
7 - 33         *2.695         0.065614
14 - 21        *0.84           0.065614
14 - 33        *2.215         0.065614
21 - 33        *1.375         0.065614
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 10 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 5 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

One-Way ANOVA - a by tiempo

ANOVA Table for a by tiempo

```
-----
Analysis of Variance
-----
Source      Sum of Squares      Df      Mean Square      F-Ratio      P-Value
-----
Between groups      4.51774          4          1.12943      11294.35      0.0000
Within groups       0.0005           5           0.0001
-----
Total (Corr.)      4.51824          9
-----
```

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of a into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 11294.4, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean a from one level of tiempo to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Table of Means for a by tiempo
with 95.0 percent LSD intervals

tiempo	Count	Mean	Std. error (pooled s)	Lower limit	Upper limit
0	2	2.745	0.00707107	2.73215	2.75785
7	2	3.57	0.00707107	3.55715	3.58285
14	2	3.945	0.00707107	3.93215	3.95785
21	2	4.2	0.00707107	4.18715	4.21285
33	2	4.76	0.00707107	4.74715	4.77285
Total	10	3.844			

The StatAdvisor

This table shows the mean a for each level of tiempo. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The standard error is formed by dividing the pooled standard deviation by the square root of the number of observations at each level. The table also displays an interval around each mean. The intervals currently displayed are based on Fisher's least significant difference (LSD) procedure. They are constructed in such a way that if two means are the same, their intervals will overlap 95.0% of the time. You can display the intervals graphically by selecting Means Plot from the list of Graphical Options. In the Multiple Range Tests, these intervals are used to determine which means are significantly different from which others.

Multiple Range Tests for a by tiempo

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
tiempo	Count	Mean	Homogeneous Groups
0	2	2.745	X
7	2	3.57	X
14	2	3.945	X
21	2	4.2	X
33	2	4.76	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 7	*-0.825	0.0399314
0 - 14	*-1.2	0.0399314
0 - 21	*-1.455	0.0399314
0 - 33	*-2.015	0.0399314
7 - 14	*-0.375	0.0399314
7 - 21	*-0.63	0.0399314
7 - 33	*-1.19	0.0399314
14 - 21	*-0.255	0.0399314
14 - 33	*-0.815	0.0399314
21 - 33	*-0.56	0.0399314

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 10 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95.0% confidence level. At the top of the page, 5 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being

used to discriminate among the means is Tukey's honestly significant difference (HSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

One-Way ANOVA - b by tiempo

ANOVA Table for b by tiempo

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	15.6231	4	3.90576	12599.24	0.0000
Within groups	0.00155	5	0.00031		
Total (Corr.)	15.6246	9			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variance of b into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 12599.2, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0.05, there is a statistically significant difference between the mean b from one level of tiempo to another at the 95.0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Table of Means for b by tiempo
with 95.0 percent LSD intervals

tiempo	Count	Mean	Std. error (pooled s)	Lower limit	Upper limit
0	2	24.77	0.0124499	24.7474	24.7926
7	2	26.005	0.0124499	25.9824	26.0276
14	2	26.925	0.0124499	26.9024	26.9476
21	2	27.375	0.0124499	27.3524	27.3976
33	2	28.46	0.0124499	28.4374	28.4826
Total	10	26.707			

The StatAdvisor

This table shows the mean b for each level of tiempo. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The standard error is formed by dividing the pooled standard deviation by the square root of the number of observations at each level. The table also displays an interval around each mean. The intervals currently displayed are based on Fisher's least significant difference (LSD) procedure. They are constructed in such a way that if two means are the same, their intervals will overlap 95.0% of the time. You can display the intervals graphically by selecting Means Plot from the list of Graphical Options. In the Multiple Range Tests, these intervals are used to determine which means are significantly different from which others.

ANEXO 6

Resultado del estudio de Focus Group:

Grupo evaluador	Tonalidad	Alimentos asociados
1	A	Crema de arvejas, fideos de espinacas, aderezo para tacos (sabor guacamole), salsa para decorar platos de comida, colados (espinaca y espárragos)
	B	Colados en base de carne y verduras, ramitas saladas, suflés, sopa de espárragos.
	C	Salsa para untar (ajo-cibulette), salsa de champiñones, masticables, incorporación a la harina de pan integral.
2	A	Crema de arvejas, fideos de espinacas, colados (espinaca y espárragos).
	B	Colados de verduras, sopa de espárragos.
	C	Mayonesa de oliva, salsa de champiñones.
3	A	Pasta de hígado, fideos de espinacas, colados (espinaca y espárragos), crema de arvejas.
	B	Flan de pistacho, crema de espárragos, rellenos de galletas, colados de verduras, salsa de aderezo.
	C	Helado moka, helado de manjar con pistacho, mayonesa de oliva con comino.



A
(0,05*)



B
(0,02*)



C
(0,01*)

* gramos de pigmento encapsulado/gramo de crema.